

Rodrigo Willamil dos Santos

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS,
ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAIS INDUZIDAS
POR CÁDMIO, COBRE E CHUMBO NAS
MACROALGAS *Gelidium floridanum*, *Hypnea musciformis*
e *Palisada flagellifera*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Zenilda Laurita Bouzon

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Rodrigo Willamil dos

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, ESTRUTURAIS E
ULTRAESTRUTURAIS INDUZIDAS POR CÁDMIO, COBRE E CHUMBO NAS
MACROALGAS *Gelidium floridanum*, *Hypnea musciformis* e
Palisada flagellifera. / Rodrigo Willamil dos Santos ;
orientadora, Prof^a Dr^a Zenilda Laurita Bouzon -
Florianópolis, SC, 2015.

125 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Algas
vermelhas. 3. Metais pesados. 4. Efeitos ultraestruturais.
5. Toxicidade. I. Bouzon, Prof^a Dr^a Zenilda Laurita. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III.
Título.

Nome completo do autor

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOVER)

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “...”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

Este trabalho é dedicado aos meus pais,
ao meu filho, namorada, parentes e
amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às leis que regem o universo, o Big-Bang, origem da vida neste planeta, a evolução das espécies (inclusive a humana) e a evolução cultural humana.

Se o encontro de pessoas durante a vida não é por acaso, antes de agradecer a todas as pessoas que passaram por minha vida até aqui, cito Antoine de Saint Exupéry:

“Vida...

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...

Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a outra...

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só...

Levam um pouco de nós mesmos e deixam um pouco de si mesmos.

Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada.

Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.

Esta é a mais bela realidade da vida...

A prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se aproxima do outro por acaso!”

Agradeço minha mãe, mulher guerreira, exemplo de ser humano, minha heroína. Mulher simples, sem diplomas, porém de conhecimento de vida imensurável. Empregada doméstica que com carinho, pulso firme e dedicação encaminhou dois filhos pela vida acadêmica até chegarem ao Doutorado, feito único em nossa família.

Dalton, meu filho, agradeço a compreensão pelos momentos ausentes, pela falta de recursos e, muitas vezes, paciência. Você é um dos maiores estímulos para que eu procure sempre ser um ser humano melhor. Ser pai é uma grande responsabilidade e nesta caminhada você é fundamental.

Agradeço meus parentes, sempre na torcida e ajudando em minha vida de uma forma ou outra, torcendo incentivando. Perdoem-me pelas ausências, a vida acadêmica nesta fase exige muito tempo e dedicação. Minha avó materna, “Dona Tita” por ter me ensinando ler e fazer cálculos simples antes mesmo de eu aprender a andar. Meus avôs, *in memoriam*, Cutelo (Estevão) e Diloca (Adelino), o primeiro por me ensinar a gostar do mar o segundo por me fazer amar a natureza, a mata, os pássaros...

Não poderia deixar de mencionar minha irmã, também Doutoranda, que me serve de inspiração para a vida acadêmica e profissional. As brigas de irmãos não são nada perto dos momentos felizes e de apoio. Te amo. Agradeço também ao Carlinhos, meu irmão, músico de mão cheia e comediante nato, pela amizade, companheirismo e bons momentos de descontração.

Agradeço também ao meu pai de coração, Pe. Genésio Sevegnani, que desde minha adolescência me auxilia com lições, auxílios e companheirismo. Torce e vibra com cada conquista. O verdadeiro pai é aquele que cria e são poucos os que entendem isso.

Enfim família... Como é bom ter um porto seguro onde possamos formar nossas bases como ser humano e partir rumo à conquista do que sonhamos.

Ao chegar na vida acadêmica, outros pais, mães e irmãos nos acolhem, costuma-se chamar de família acadêmica. Dentro da vida acadêmica também há brigas, discussões, companheirismo, apoio e tudo mais que se encontra numa família. Há muita gente para agradecer aqui, estas pessoas que me auxiliaram desde a época da graduação permitiram que hoje aqui eu chegasse. Prof^a Verinha, Prof. Leandro Belinaso, Budha (Rafael Alves, *in memoriam*), Jaqueline Zimmer, Carlos E. da Rosa, Giordano W. Caloni, Ricardo Garcez, Raphael Reinike, entre tantos outros...

Quanto à Pós.... Do mestrado até aqui, no doutorado, a muita gente eu devo meu MUITO OBRIGADO! A começar pela Prof^a Dr^a Zenilda, que acreditou e estimulou meu objetivo acadêmico. Abriu as portas do laboratório e permitiu meu avanço na vida acadêmica. Agradeço também à Prof^a Dr^a. Luciane Ouriques pelo auxílio nesta caminhada acadêmica. Aos Professores Dr. Eduardo Cargnin, Dr. Carlos Soares, Dr. José Bonomi Baruffi, Dr. Paulo Horta, Dr^a Fungyi, foram várias as interferências e auxílios durante todo este processo.

Companheiros desta nave chamada LaBCeV, foram anos dentro deste laboratório e nele encontrei um amigo que virou “pai acadêmico”. Foram várias as interferências e discussões, debates, brigas, pazes e tudo isso permitiu minha evolução acadêmica. Muito obrigado Éder! Aos companheiros de laboratório e que também se tornaram amigos: Carmen, Giulia, Gabriel, Ticiane, Fernanda Kokowicz, Marthiellen, Luz K, Claudiane, Marianne, Debora. Dentre as pessoas que conheci nesta vida acadêmica, uma delas, de colega de trabalho tornou-se também amiga e, a amizade, aprofundou... Obrigado Iza por todo auxílio, carinho, estímulo e compreensão, te amo.

Agradeço aos professores do PPGBCD UFSC pelas aulas, auxílios, estímulos... Aos funcionários do LCME Deise, Eliana e Eduardo. Aos funcionários dos LAMEBs Chirle, Demétrius, Bibiana e Cris.

A CAPES (REUNI, DS) pela bolsa de pesquisa, ao CNPq e FAPESC pelo auxílio financeiro.

Obrigado UFSC por permitir a realização do sonho de ser biólogo e possibilitar a realização do mestrado e do doutorado no PPG BCD.

.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

(Mahatma Gandhi)

“Sonha e serás livre de espírito...Luta e serás livre na vida.”

(Che Guevara)

RESUMO

Os metais pesados, como cádmio, cobre e chumbo estão entre os poluentes mais comuns encontrados nos efluentes industriais e urbanos. Altas concentrações destes metais podem causar efeitos tóxicos graves, especialmente para os organismos que vivem nos ecossistemas aquáticos. Estes metais são encontrados com maior frequência no meio aquático e são considerados contaminantes ambientais que podem afetar o desenvolvimento, o crescimento, a fotossíntese e a respiração, organização celular e a morfologia de algas. As algas *G. floridanum*, *H. musciformis* e *P. flagellifera* possuem importância econômica por produzirem ágar, carragenana e compostos secundários halogenados, respectivamente. O presente estudo avaliou os efeitos fisiológicos, estruturais e ultraestruturais de Cd, Cu e Pb em *G. floridanum*, Cu e Pb em *H. musciformis* e Pb sob duas irradiâncias em *P. flagellifera*. Os experimentos com *G. floridanum* e *H. musciformis* foram realizados com PAR de 80 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante sete dias. Para *G. floridanum* foram utilizadas as concentrações de 50 e 100 μM de Cd, Cu e Pb. Para *H. musciformis* e 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} de Cu e 3,5 e 7 mg.Kg^{-1} de Pb. Para os experimentos com *P. flagellifera* foram realizados tratamentos e 0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg^{-1} de Pb sob as PAR de 50 e 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As amostras de *G. floridanum* expostas ao Cd, Cu e Pb mostraram despigmentação do talo, alteração do cloroplasto, degeneração dos tilacóides, e diminuição em pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila *a* e ficobiliproteínas, em amostras tratadas com Cd e Cu. Além disso, a espessura da parede da célula e a quantidade de plastogl\u00f3bulos aumentou. A microanálise de raios X (EDS) detectou Cd, Cu e Pb absorvidos pelas paredes celulares. J\u00e1 nas amostras de *H. musciformis*, observou-se v\u00e1rias altera\u00e7\u00f5es intracelulares decorrentes da exposi\u00e7\u00e3o ao chumbo e cobre, incluindo diminui\u00e7\u00e3o da ficobiliprote\u00ednas, bem como danos aos tilac\u00f3ides. Al\u00e9m disso, a quantidade de caroten\u00f3ides, flavon\u00f3ides e compostos fen\u00f3licos foram diminu\u00eddos, como um reflexo aparente da mudan\u00e7a de rota metab\u00f3lica para a produ\u00e7\u00e3o de antioxidantes contra esp\u00e9cies reativas de oxig\u00eanio. A exposi\u00e7\u00e3o ao cobre e chumbo tamb\u00e9m causou um aumento do n\u00famero de gr\u00e3os de amido das flor\u00eddeas. Observou-se ainda, uma diminui\u00e7\u00e3o das taxas de crescimento de *H. musciformis*. Quanto ao experimento com *P. flagellifera* a PAR de 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ promoveu uma diminui\u00e7\u00e3o na quantidade de ficobiliprote\u00ednas, aumento na quantidade de clorofila *a* e caroten\u00f3ides, promoveu leve aumento da viabilidade celular quando comparado com a irradi\u00e2ncia de 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Com maior intensidade de PAR, os

tratamentos com Pb tiveram respostas mais intensas, como maior diminuição de taxa de crescimento. Os tratamentos com metais indicaram que tanto o Cd como Pb afetam negativamente o desempenho metabólico e a ultraestrutura celular de *G. floridanum* e porém o mais tóxico foi Cu. Para *H. musciformis*, no entanto, os resultados indicaram diferente susceptibilidade a diferentes concentrações de cobre e chumbo, sendo o Cu também o mais tóxico para esta espécie. Quanto ao efeito de Pb em *P. flagellifera*, os resultados se mostraram mais intensos no tratamento com maior concentração de Pb tratado sob PAR de $100 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Palavras-chave: Cádmio, cobre, chumbo, ultraestrutura, pigmentos fotossintéticos, taxa de crescimento, toxicidade.

ABSTRACT

Heavy metals such as cadmium, copper and lead are among the most common pollutants found in both industrial and urban effluents. High concentrations of these metals cause serious toxic effects, especially for organisms living in the aquatic ecosystem. These metals are most often found as environmental contaminants, and they have been shown to cause to affect the development, growth, photosynthesis and respiration, cellular organization and morphological algae. Algae *G. floridanum*, *H. musciformis* and *P. flagellifera* have economic importance for producing agar, carrageenan and halogenated compounds side, respectively. This study evaluated physiological and ultrastructural effects of Cd, Cu and Pb in *G. floridanum*, Cu and Pb in *H. musciformis* and Pb in two irradiances in *P. flagellifera*. The experiments with *G. floridanum* and *H. musciformis* were performed with PAR 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for seven days. For *G. floridanum* were used concentrations of 50 and 100 μM of Cd, Cu and Pb. For *H. musciformis* and 0.05 and 0.1 mg.Kg^{-1} Cu and 3.5 to 7 mg.Kg^{-1} Pb. For the experiments with *P. flagellifera* treatments were performed and 0.5, 2.5 and 12.5 mg.Kg^{-1} of Pb under the PAR 50 and 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. *G. floridanum* samples exposed to Cd, Cu and Pb shown depigmentation of the stem, change the chloroplast thylakoid degeneration, and decrease in photosynthetic pigments such as chlorophyll and phycobiliproteins, in samples treated with Cd and Cu. Furthermore, the thickness of the cell wall and the amount of plastoglobuli increased. The X-ray microanalysis (EDS) found Cd, Cu and Pb absorbed by the cell walls. Already in the samples of *H. musciformis*, several intracellular changes was observed from exposure to lead and copper, including decreased phycobiliproteins as well as damage to the thylakoids. Furthermore, the amount of carotenoids, flavonoids and phenolic compounds were decreased as a reflection of apparent change in the metabolic pathway for the production of antioxidants against reactive oxygen species. The copper and lead exposure also caused an increase in the number of florideans starch grains. There was also a decrease in the growth rates of *H. musciformis*. As to experiment with *P. flagellifera* the PAR 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ promoted a reduction in the amount of phycobiliproteins, increasing the amount of chlorophyll carotenoids, promoted a slight increase in cell viability compared to irradiance 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. With higher intensity of PAR in Pb treatments had stronger responses as greater reduction in growth rate. Metal treatments indicated that both Cd and Pb adversely affect the metabolic performance

and cell ultrastructure of *G. floridanum* and yet most toxic was Cu. *H. musciformis*, however, the results showed different susceptibility to different concentrations of copper and lead, and Cu also more toxic for this this species. As for Pb effect in *P. flagellifera*, the results were more intense in the treatment with 12.5 mg.Kg⁻¹ Pb treated under PAR 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Key words: Cadmium, copper, lead, ultrastructure, photosynthetic pigments, growth rates, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aspecto morfológico de <i>G. floridanum</i> das amostras controle após exposição às diferentes concentrações de Cd, Cu e Pb.....	54
Figura 2.	Imagens de microscopia confocal de <i>G. floridanum</i>	57
Figura 3.	Amostras controle de <i>G. floridanum</i> observadas no MET.....	58
Figura 4.	Micrografias de MET das amostras de <i>G. floridanum</i> tratadas com Cd.....	59
Figura 5.	Micrografias de MET das amostras de <i>G. floridanum</i> tratadas com Cu.....	61
Figura 6.	Micrografias de MET das amostras de <i>G. floridanum</i> tratadas com Pb.....	62
Figura 7.	Superfície do talo de <i>G. floridanum</i> observados no MEV.....	63
Figura 8.	Valores de absorção e taxa de bioconcentração de <i>H. musciformis</i> após o período experimental.....	74
Figura 9.	Taxas de Crescimento de <i>H. musciformis</i> após o período experimental.....	75
Figura 10.	Morfologia das amostras de <i>H. musciformis</i> após 7 dias de tratamento.....	76
Figura 11.	Parâmetros fotossintéticos das amostras de <i>H. musciformis</i> após os tratamentos com Cu e Pb.....	78
Figura 12.	YII, YNO e YNPQ das amostras de <i>H. musciformis</i> após 7 dias de exposição ao Cu e ao Pb.....	79
Figura 13.	Taxa relativa de transporte de elétrons versus luz emitida e medida pelo PAM nas amostras de <i>H. musciformis</i> tratadas por 7 dias com Cu e Pb.....	80
Figura 14.	Microscopia de luz de cortes transversais de talos de <i>H. musciformis</i> após 7 dias de cultivo tratadas com PAS.....	81
Figura 15.	Micrografias de MET do controle e dos tratamentos com Cu de <i>H. musciformis</i> após o período experimental.....	82
Figura 16.	Micrografias de MET dos tratamentos com Pb de <i>H. musciformis</i> após o período experimental.....	83
Figura 17.	MEV da superfície de <i>H. musciformis</i> após o experimento.....	84

Figura 18.	Taxas de Crescimento de <i>P. flagellifera</i> após o período experimental.....	94
Figura 19	Morfologia das amostras de <i>P. flagellifera</i> após tratamentos com PAR 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	95
Figura 20	Morfologia das amostras de <i>P. flagellifera</i> após tratamentos com PAR 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	96
Figura 21.	Viabilidade celular das amostras de <i>P. flagellifera</i> após o período experimental.....	97
Figura 22.	Alterações na concentração de Cl. <i>a</i> e carotenóides das amostras do campo e dos tratamentos realizados em <i>P. flagellifera</i>	99
Figura 23.	Alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos (AFC, FC e FE) nas amostras do campo e nos tratamentos realizados em <i>P. flagellifera</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Metodologias aplicadas a cada alga em estudo.....	42
Tabela 2.	Bioabsorção de metais pesados de <i>G. floridanum</i> cultivados com 50 μM e 100 μM de Cd, Cu e Pb durante um período de 7 dias. Dados são médias \pm SD (n = 4).....	52
Tabela 3.	Taxa de crescimento (TC) de <i>G. floridanum</i> após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de Cd, Cu e Pb.....	54
Tabela 4.	Pigmentos fotossintéticos: clorofila <i>a</i> , aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina, carotenóides e flavonóides de <i>G. floridanum</i> após o experimento.....	55
Tabela 5.	Análises com MEV mostrando a porcentagem de átomos na superfície de amostras de <i>G. floridanum</i> cultivados sem metais pesados e com 50 μM e 100 μM de Cd, Cu e Pb durante um período de 7 dias.....	64
Tabela 6.	Alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos, fenólicos, flavonóides, carotenóides e proteínas totais nos tratamentos controle, com Cu e Pb, após 7 dias de cultivo de <i>H. musciformis</i>	77
Tabela 7.	Mudanças em DIYII, DIYNO e DIYNPQ nos tratamentos controle, com Cu e Pb, após 7 dias de cultivo de <i>H. musciformis</i>	79
Tabela 8.	Análises com EDS-MEV, porcentagem de átomos na superfície das amostras <i>H. musciformis</i> tratamentos.....	85
Tabela 9.	Análises com EDS-MEV, porcentagem de átomos na superfície das amostras de <i>P. flagellifera</i> tratados com PAR 50 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	102
Tabela 10.	Análises com EDS-MEV, porcentagem de átomos na superfície das amostras de <i>P. flagellifera</i> tratados com PAR 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	103
Erro! Indicador não definido.		

ABREVIATURAS E SIGLAS

Ácido periódico de Schiff (PAS)
Aloficocianina (AFC)
Amido das florídeas (A)
Azul de Toluidina (ATO)
Brometo 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)
Célula cortical (CC)
Célula subcortical (SC)
Clorofila *a* (Cl *a*)
Cloroplasto (C)
Curva rápidas de luz (CRL)
Eficiência fotossintética (α ETR)
Fator de absorção (FA)
Fator de Bioconcentração (BCF)
Ficocianina (FC)
Ficoeritrina (FE)
Fluorescência basal da clorofila (F_0)
Fluorescência máxima da clorofila (F_m)
Fluorímetro de Pulso Modulado (PAM)
Fotossistema II (PS II)
Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LaBCeV)
Microscopia de Luz (ML)
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
Mitocôndria (M)
Núcleo (N)
Nucléolo (Nu)
Parede celular (PC)
Plastoglôbulos (P)
Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR)
Rendimento quântico efetivo (YII)
Taxa de crescimento (TC)
Taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max})
Taxa Relativa de transporte de elétrons (ETR)
Vacúolo (V)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Aspectos gerais das algas.....	27
1.2. Aspectos gerais da divisão Rhodophyta	27
1.3. <i>Gelidium floridanum</i> WR Taylor	29
1.4. <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J. V. Lamouroux	29
1.5. <i>Palisada flagellifera</i> (J. Agardh) K. W. NamNamNam	30
1.6. Relações entre metais pesados e macroalgas	30
1.6.1. Cádmio.....	31
1.6.2. Cobre.....	33
1.6.3. Chumbo	33
2.JUSTIFICATIVA.....	35
3.OBJETIVOS	37
3.1 Objetivos Gerais.....	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 METODOLOGIA	38
4.1. Coleta e processamento de <i>G. floridanum</i> , <i>H. musciformis</i> e <i>P. flagellifera</i>	38
4.2. Condições de cultivo.	38
4.3. Teste de letalidade com cádmio, cobre e chumbo.....	39
4.4. Avaliação dos efeitos com: cádmio, cobre e chumbo.	39
4.5. Taxas de crescimento (TC).....	39
4.6. Concentração de Cd, Cu e Pb em amostras de água do mar e nas algas.	40
4.7. Processamento para análises em microscópio confocal	40
4.8. Processamento para análises em microscópio de luz.	41
4.9. Processamento para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET).	41
4.10. Processamento para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV).	42
4.11. Medida da eficiência fotossintética.	43
4.12. Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes.	44
4.12.1. Extração e dosagem de clorofila <i>a</i>	44
4.12.2. Extração e dosagem das ficobiliproteínas.	44
4.12.3. Extração e dosagem de carotenóides.	45
4.13. Extração e dosagem de flavonóides.	45
4.14. Extração e dosagem de compostos fenólicos totais.....	46
4.15. Proteínas totais.	46
4.16. Viabilidade celular (MTT).	47
4.17. Tratamento da vidraria e materiais de descarte após a sua utilização.....	47
4.18. Análise e interpretação de dados.	48

4.19. Quadro resumo das metodologias.	48
5. CAPÍTULO I: Bioadsorção de cádmio, cobre e chumbo pela macroalga vermelha <i>Gelidium floridanum</i> : Respostas fisiológicas e ultraestruturais.	49
5.1. Introdução.	50
5.2. Resultados.	52
5.2.1. Absorção de cádmio, cobre e chumbo.	52
5.2.2. Taxas de crescimento (TC).	53
5.2.3. Pigmentos fotossintéticos e flavonóides.	55
5.2.4. Microscopia confocal.	56
5.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).	58
5.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).	63
5.3. Discussão.	64
5.4. Conclusão.	69
6. CAPÍTULO II: O efeito de diferentes concentrações de cobre e chumbo na morfologia e fisiologia de <i>Hypnea musciformis</i> cultivada <i>in vitro</i> : uma análise comparativa.	71
6.1. Introdução.	72
6.2. Resultados.	73
6.2.1. Absorção de cobre e chumbo.	73
6.2.2. Taxas de crescimento.	75
6.2.3. Pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos totais, flavonóides e proteínas totais.	76
6.2.4. Parâmetros fotossintéticos.	77
6.2.5. Microscopia de luz – ácido periódico de Schiff (PAS).	80
6.2.6. Observações ao microscópio eletrônico de transmissão.	81
6.2.7. Microscopia eletrônica de varredura.	84
6.3. Discussão.	86
6.4. Conclusão.	89
7. CAPÍTULO III: Análise dos efeitos de chumbo e duas radiações fotossinteticamente ativas, 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em <i>Palisada flagellifera</i>	91
7.1. Introdução.	91
7.2. Resultados.	93
7.2.1. Taxas de crescimento.	93
7.2.2. Viabilidade celular (MTT).	96
7.2.3. Pigmentos fotossintetizantes.	98
7.2.4. Microscopia eletrônica de varredura.	100
7.3. Discussão.	104
7.4. Conclusão.	107
8. CAPÍTULO IV: Considerações finais.	109
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	111

1. INTRODUÇÃO.

1.1. Aspectos gerais das algas.

As algas são abundantes em ambientes marinhos, dulciaquícolas e de água salobra bem como em ambientes úmidos, mas também há registro de espécies de algas vivendo nos solos de deserto (Lee 2008; Gamal 2010). Tornam-se base da cadeia alimentar, pois são os maiores produtores de compostos orgânicos, além de serem responsáveis por grande parte da produção de oxigênio do planeta (Lee 2008; Gamal 2010). Possuem um papel ecológico importante servindo de abrigo e berçário para muitas espécies de peixes e crustáceos. Muitas espécies podem ser utilizadas para a extração de ficolóides como ágar e carragenana (South e Whittick 1987). Constituem um grupo de organismos fotossintetizantes, não vasculares, dotados de estruturas reprodutivas sem proteção, onde produzem esporos e são desprovidas de sementes e flores (South e Whittick 1987).

As algas pertencem a um grupo sem valor taxonômico que compreende desde cianobactérias a organismos eucarióticos fotossintetizantes uni ou multicelular sem organização tecidual e fotossintetizantes (Lee 2008). As macroalgas estão inseridas nas divisões Rhodophyta, Chlorophyta e Ochrophyta. Possuem características semelhantes às plantas terrestres como: pigmentos acessórios à fotossíntese como os carotenóides (fucoxantina e β -caroteno), e a clorofila *a* presentes nas algas. A clorofila *a* apresenta as mesmas vias metabólicas básicas para síntese das plantas, bem como, as proteínas e os polissacarídeos biossintetizados (South e Whittick 1987).

1.2. Aspectos gerais da divisão Rhodophyta.

Esta divisão é considerada o grupo de macroalgas com maior número de espécies, quando comparadas com o número de espécies marinhas conhecidas (Woelkerling 1990, <http://www.algaebase.org/search/taxonomy/> 25/08/2014 acessado às 16:40h), as espécies de Rhodophyta são estimadas em 135955 espécies (Guiry e Guiry 2014). As Rhodophyta são divididas em seis classes: Florideophyceae, Compsopogonophyceae, Bangiophyceae, Porphyridiophyceae, Stylonematophyceae e Rhodellophyceae (Yoon *et al.* 2006). A maioria dos gêneros compreende organismos pluricelulares marinhos, sendo que 20 deles são representantes de água doce e 10

possuem algas unicelulares (Lee 1989; van den Hoek *et al.* 1989). A diversidade nas formas de reprodução é bem evidenciada na reprodução sexual da divisão Rhodophyta, sendo considerada a mais complexa do reino vegetal. Por apresentarem um histórico evolutivo muito diverso, as algas constituem um grupo polifilético (Graham e Wilcox 2000).

São abundantes na região equatorial, porém ocorrem em todas as latitudes. São encontradas desde a região entre marés, onde predominam, até em profundidades de 200m (Lee 1989).

As Rhodophyta possuem células eucarióticas, ausência de flagelos, ligações intercelulares como característica exclusiva deste grupo (Reviere 2006) e presença de pigmentos acessórios localizados nos tilacóides e organizados em estruturas denominadas ficobilissomos (Gantt 1981) e também são exclusivos das Rhodophyta (South e Whittick 1987). Estes pigmentos acessórios são a ficoeretrina (pigmento vermelho), ficocianina e aloficocianina (pigmentos azuis). O pigmento fotossintetizante desta divisão é a clorofila *a*. Os cloroplastos não possuem tilacóides agregados e apresentam sobre as membranas dos tilacóides os ficobilissomos que auxiliam a clorofila *a* no fotossistema II (PS II) energizando-a, pois estes pigmentos acessórios captam energia luminosa em comprimentos de onda diferente das clorofilas (Gantt 1981; Talarico 1996). Devido às diferentes concentrações de pigmentos auxiliares este grupo taxonômico pode apresentar diversidade na coloração, podendo ser roxa, vermelha clara ou escura, azulada, amarelada, esverdeada, amarronzada ou negrecida (Oliveira 2003). Este grupo de algas apresenta plastídios semelhantes aos das cianobactérias (Reviere 2006).

Outra característica das Rhodophyta é a presença do amido das florídeas, também conhecido como rodamilo, como açúcar de reserva localizado fora do cloroplasto. Sendo o principal produto de reserva das Rhodophyta, é um polímero constituído por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) (Painter 1983) e pontos de ramificação no carbono-6 similar a amilopectina do amido (Raven 1990).

A parede celular desta Divisão é constituída de polissacarídeos sulfatados (ágar e carragenana) na parte mucilaginosa (Reviere 2006), que conferem importância ecológica e econômica a este grupo (Guimarães *et al.* 1999) e de celulose na sua parte fibrilar (Reviere 2006).

1.3. *Gelidium floridanum* **WR Taylor.**

As espécies do gênero *Gelidium* JV Lamouroux são conhecidas por produzir ágar de alta pureza, com baixo teor de sulfato. Como tal, os fornecedores podem cobrar preços altos (Sousa-Pinto *et al.* 1999). Desta forma, como uma fonte de extração de ágar em todo o mundo, esta espécie tem alcançado uma importância significativa, sendo o ágar é utilizado em diversos produtos com propriedades de gelificação e uso em meios de culturas bacteriológicos (Armisen *et al.* 1995). No Brasil esta espécie é distribuída ao longo da costa do Espírito Santo até o estado do Rio Grande do Sul (<http://www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br/busca3.php?id=334>, acessado em 15/10/2014 às 16:00h).

No Brasil, alguns estudos foram feitos com esta espécie para avaliar a adesão dos esporos ao substrato, o processo de germinação (Bouzon *et al.* 2006), também para analisar os efeitos da radiação UV-B na germinação dos tretrásporos, no desenvolvimento de tretrásporos jovens em espécimes adultos avaliando a ultraestrutura, os pigmentos e os sistemas antioxidantes (Scariot *et al.* 2013; Schmidt *et al.* 2012a). Yokoya *et al.* (2010) avaliou a presença de citocininas, auxinas e ácido absísico endógenos nesta espécie. Finalmente, Simioni *et al.* (2014) caracterizaram a participação do sistema de endomembranas no processo inicial de germinação, com o uso de brefeldina A.

1.4. *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux.

Esta espécie é amplamente distribuída no litoral brasileiro, ocorrendo desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul, sendo mais abundante em algumas regiões (Oliveira 2003; Nunes 2005). Possui uma característica singular que permite diagnosticar a espécie que é a presença de processo em forma de ganchos nas porções terminais dos eixos principais, as gavinhas. Estes ganchos permitem que esta alga viva como epífita sobre outras algas ou substratos que sirvam de suporte (Bouzon 2006).

A maioria das populações de *H. musciformis* no Brasil apresentam coloração vermelho-marrom, embora linhagens deficientes em ficoeritrina com coloração esverdeada também sejam encontradas (Oliveira 2003). Esta espécie possui *Kappa* carragenana em sua parede celular (Bouzon 2006), mostrando um grande potencial econômico que,

segundo Oliveira (1981) é uma das espécies mais indicadas para extração de carragenana no Brasil.

Foram pesquisados métodos de cultivos desta espécie na costa da Índia (Ganesan *et al.* 2006) e no Brasil em substrato de concreto, obtendo resultados favoráveis de cultivo até 2,1 m de profundidade (Berchez *et al.* 1993). Também há trabalhos com *H. musciformis* relatando os efeitos antioxidante, citotóxico e hemolítico de galactanos sulfatados oriundos desta alga (Chagas *et al.* 2012) além de formação de cetosteróides através de extratos de *H. musciformis*. Para *H. musciformis* existem ainda os trabalhos de Schmidt *et al.* (2012b) que avaliaram os efeitos de radiação UV-B e Bouzon *et al.* (2012b) estudaram os efeitos de cádmio na ultraestrutura e metabolismo.

1.5. *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K. W. Nam.

Presente na costa brasileira, do Ceará à Santa Catarina (Fujii e Senties 2005), esta espécie possui talo cartilaginoso rígido, pouco ramificado e apresenta crescimento lenticular nas paredes celulares das células medulares e não apresentam espaços intercelulares (Fujii *et al.* 2006). Há relatos na literatura que esta macroalga possui atividade antiincrustante (Da Gama *et al.* 2008) e atividade anti-herbivoria para o anfípodo *Elasmopus brasiliensis* (Dana) (Weidner *et al.* 2004). Alguns estudos referem-se à composição da agarana presente em *P. flagellifera* (Fernandes *et al.* 2014) mostrando que esta tem atividade virucida e antipenetração viral nas células hospedeiras (células HeLa, derivadas do câncer por HPV). Há estudo relatando que esta espécie não possui atividade antiincrustante para o mexilhão *Perna perna* (Machado e Brooke 2007). Outras pesquisas revelaram que extrato de *P. flagellifera* possuem atividade citotóxica para células tumorais em estágio inicial (Stein *et al.* 2011). Estudos com efeito de radiação UV-B nesta espécie (Pereira *et al.* 2014) mostraram redução na taxa de crescimento, no montante de pigmentos fotossintetizantes e ainda na ultraestrutura dos cloroplastos onde houve ruptura nas membranas dos cloroplastos e aumento no número de plastoglobulos.

1.6. Relações entre metais pesados e macroalgas.

Segundo Bodnar (2009), a tendência a demanda de cobre e outros metais pesados como zinco e chumbo é dobrar nos próximos anos. Metais como cádmio, chumbo e cobre já poluem o ambiente desde o antigo

império Romano. Eles eram utilizados para a confecção de vários artefatos, porém eram extraídos em quantidade menor que atualmente (Nriagu 1996). Nos últimos anos, o aumento gradativo das ações industriais promoveu a poluição de águas estuarinas, rios, lagos e águas costeiras por metais pesados, a pesquisa de métodos para retirar metais pesados de efluentes líquidos, bem como seus efeitos em organismos aquáticos tornou-se extremamente importante (Hashim e Chu 2003; Calfa e Torem 2007).

Muitas algas são capazes de produzir substâncias quelantes que realizam a detoxificação dos metais pesados (Küpper *et al.* 2002) o que poderia ser uma das causas para que as algas possam sobreviver em ambientes contaminados (Hu *et al.* 1996). A utilização de algas na bioabsorção de metais pesados com o intuito de retirá-los dos ambientes marinhos vem sendo estudada em diferentes trabalhos (Ahalya *et al.* 2003; Sheng *et al.* 2004; Alessandretti *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2005; Calfa e Torem 2007). Uma vez que apresentam um custo baixo em relação a outras técnicas (Ahalya *et al.* 2003; Calfa e Torem 2007). As paredes celulares das algas marinhas possuem uma alta capacidade em absorver metais pesados em baixa concentração em efluentes líquidos industriais (Amado-Filho *et al.* 1997; Silva *et al.* 2003). Amado-Filho *et al.* (1999) afirmaram que a presença de polissacarídeos específicos na parede celular de algumas algas permite o sequestro e precipitação de metais pesados. Por outro lado, Alessandretti *et al.* (2005) observaram que frequentemente as paredes celulares das algas são porosas o que facilita a entrada de íons metálicos que, em meio aquoso, ligam-se a complexos orgânicos como citratos e aminoácidos e desta forma passam pelas membranas biológicas. Assim, macroalgas podem servir de biomonitores por acumularem metais pesados (Domouhtsidou *et al.* 2000; Küpper *et al.* 2002). Outro fator preocupante para contaminação ambiental é o fato das algas servirem de produtores primários para muitas cadeias alimentares pois, quando contaminadas, podem transferir esta contaminação para outros organismos (Roberts *et al.* 2006).

1.6.1. Cádmio.

O elemento químico cádmio é amplamente utilizado na confecção de eletroeletrônicos e baterias (Hu *et al.* 1996; Hashym e Chu 2004). O cádmio não faz parte de moléculas orgânicas, entretanto, este metal pode ligar-se a metaloproteínas e metaloenzimas, que são enzimas e proteínas com sítios de ligação metálicos, neutralizando ou inibindo suas funções.

Além disso, uma grande afinidade para ligar-se a grupos sulfatados (Vallee e Ulmer 1972; Lockwood 1976). O cádmio também prejudica a conformação do DNA e RNA e possui efeitos teratogênicos (Vallee e Ulmer 1972). Este metal pode interferir na absorção de nutrientes importantes para as plantas como cálcio, magnésio, fósforo e potássio. Em milho foi verificada clorose devido ao cádmio ter provocado mudança na proporção de Fe/Zn (Das *et al.* 1997). Em macroalgas, o cádmio pode estar relacionado ao decréscimo na absorção de cálcio (Diannelidis e Delivopoulos, 1997), pode ainda, afetar a fotossíntese, o volume de cloroplasto e pirenóides da microalga verde *Dunaliella minuta* (Visviki e Rachlin 1992). Em um estudo realizado com *Gracilaria tenuistipitata* C. F. Chang & B. M. Xia, observou-se que, esta espécie por estar em regiões costeiras, é uma das que mais acumula metais pesados como o cádmio, sendo este um dos metais de maior perigo de toxicidade para organismos aquáticos (Hu *et al.* 1996).

Estudos de bioabsorção de cádmio mostraram que as algas vermelhas tais como: *G. edulis* (S.G. Gmelin) P. C. Silva, *G. changii* (B. M. Xia & I. A. Abbott) I. A. Abbott, J. Zhang & B. M. Xia, *G. salicornia* (C. Agardh) E.Y. Dawson e *Laurencia obtusa* (Hudson) J. V. Lamouroux são eficientes na absorção de cádmio, porém menos eficientes que algumas algas Phaeophyceae como *Sargassum siliculosum* J. Agardh e *S. asperifolium* Hering & G. Martens ex J. Agardh (Hamdy, 2000; Hashim & Chu, 2004). O cádmio diminuiu a taxa de crescimento de *G. tenuistipitata* (Collén *et al.* 2003) e *G. lemaneiformis* Bory de Saint-Vincent, Greville 1830 (Xia *et al.* 2004) e *Ulva lactuca* (Kumar *et al.* 2010). Este efeito inibidor do cádmio nas taxas de crescimento também foi verificado em *Gracilaria domingensis* (Santos *et al.* 2013) e em *Hypnea musciformis* (Bouzon *et al.* 2012b). Foi visto, ainda, que cádmio induziu stress oxidativo em cloroplastos de algas (Pinto *et al.* 2003), peroxidação de lipídios e indução de estresse oxidativo em *G. tenuistipitata* (Collén *et al.* 2003). Foi verificado ainda que cádmio, em *G. lemaneiformis*, danificou as ficobiliproteínas interferindo na absorção de energia luminosa e sua conseqüente transferência para os centros de reação dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) (Xia *et al.*, 2004). Bouzon *et al.* (2012b) verificaram que cádmio promove mudanças na ultraestrutura de *H. musciformis* como aumento da parede celular, desorganização dos tilacóides e acúmulo de plastoglôbulos nos cloroplastos. Já o trabalho de Santos *et al.* (2013) mostrou que *G. domingensis* também sofreu modificações ultraestruturais promovidas por cádmio como aumento da

parede celular, desorganização dos tilacóides, aumento no montante de plastoglôbulos e, ainda, vacuolização das células corticais e medulares.

1.6.2. Cobre.

O cobre faz parte de moléculas importantes como proteínas, é um micronutriente importante para as algas, porém, quando presente em altas concentrações como íon livre no ambiente provoca estresse oxidativo nas algas (Ratkevicius 2003). Este metal é utilizado na confecção de tintas anti-incrustantes, no tratamento de doenças em peixes, em químicos agrícolas, e como algicida, o que aumenta a necessidade de estudos quanto aos efeitos do cobre nos organismos aquáticos (Mamboya 1999; Yruela 2005). Além de causar deficiência na absorção de fósforo, decréscimo na fotossíntese e na respiração, redução na taxa de crescimento (Mamboya 1999; Lee *et al.* 2005). A presença deste metal pesado em ambientes aquáticos marinhos é uma constante crescente (Hashim e Chu 2003; Calfa e Torem 2007). Segundo Yruela (2005) existem proteínas transportadoras de cobre nas células vegetais presentes na membrana celular, corpos de Golgi, cloroplastos e mitocôndrias o que permite a entrada de cobre nas células das algas presentes em ambientes contaminados. Desta forma, pode-se observar alterações ultraestruturais em várias algas como alterações ultraestruturais em *Dunaliella minuta* Lerche como diminuição no volume dos pirenóides e de cloroplastos (Visvik e Raschlin 1992). Em *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. o cobre induziu estresse oxidativo promovendo a ativação da ascorbato peroxidase e glutathione. Entretanto, o acúmulo de grandes taxas de cobre no talo desta alga confere a *E. compressa* uma grande tolerância ao cobre (Ratkevicius *et al.* 2003). Gouveia *et al.* (2013) verificaram que cobre promove alterações ultraestruturais em *G. domingensis* como aumento de espessura da parede celular com depósitos de metais na parede celular e deformações nos tilacóides. Estas modificações ultraestruturais também foram observadas em *G. floridanum* tratadas com cobre (Santos *et al.* 2014).

1.6.3. Chumbo.

Este metal existe em uma única variedade alotrópica, metálica, cinza, mole, de baixo ponto de fusão. O elemento químico chumbo, no meio ambiente, também é resultante de atividades antrópicas, não

fazendo parte da composição química de moléculas orgânicas (Ahalya *et al.* 2003).

O chumbo possui uma alta afinidade por complexos serinas e treoninas de proteínas e enzimas como lipoamina desidrogenase, ATPases e o ácido δ -aminolevulinico desidrase inibindo-as (Vallee e Ulmer 1972). Apresenta-se extremamente tóxico ao sistema nervoso de ratos (Cornejo-Garrido *et al.* 2011), sistema nervoso humano e ao sistema reprodutivo de mamíferos (Sheng *et al.* 2004). Lombardi e Vieira (1998) constataram que *Synura* sp. (Ochrophyta, colonial) produz carboidratos extracelulares de que formam complexos de alto peso molecular com chumbo amenizando os efeitos tóxicos deste metal, porém observaram, também, o decréscimo na taxa de crescimento na presença de chumbo.

A fotossíntese e a respiração da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin foram inibidas quando presentes altos níveis de chumbo (Woolery e Lewin 1976). Pinchasov *et al.* (2006) analisaram que a cianobactéria *Synechococcus leopoliensis* apresenta decréscimo na taxa fotossintética e na quantificação de clorofila relacionadas com o aumento na concentração de chumbo bem como, o aumento do tempo de exposição. Janik *et al.* (2013) observaram que chumbo promove em centeio a queda na intensidade de fluorescência aos compostos (complexos protéicos formadores da clorofila e o complexo antena do fotossistema I) do núcleo do fotossistema I. Estes mesmos autores observaram que tratamentos com chumbo também reduziram energia de excitação absorvida pela clorofila *b* e carotenóides do complexo antena o que por sua vez provoca diminuição na taxa fotossintética. Arunakumara *et al.* (2009) também observaram como efeito de exposição ao chumbo decréscimo na taxa de crescimento, na quantidade de clorofila *a*, na quantidade de carotenóides, na quantidade de ficocianina, bem como alterações ultraestruturais nos cloroplastos da cianobactéria *Scynechocystis* sp.; PCC 6803. Todos estes efeitos também haviam sido relacionados com o aumento de concentração de chumbo. Santos *et al.* (2014) observaram que chumbo além de influenciar negativamente as taxas de crescimento, também promoveu alterações na ultraestrutura dos cloroplastos de *G. floridanum*.

2. JUSTIFICATIVA.

As algas marinhas são importantes para o ecossistema marinho por servirem de abrigo, alimento e berçário para várias espécies de peixes, crustáceos e moluscos marinhos. Também constituem recurso renovável de grande significado econômico, ainda pouco aproveitado no Brasil, para produção de ágar, carragenana, metabólitos de interesse farmacológico e como absorventes de metais pesados. Algas como, *Gelidium floridanum* que apresenta demasiada importância como produtora de ágar e *Hypnea musciformis* que produz *Kappa* carragenana, são frequentes no litoral catarinense possuindo grande potencial para serem cultivadas. Por outro lado, metais como cádmio e cobre são observados em níveis significativos na Baía da Ilha de Santa Catarina (Tureck *et al.* 2006), desta forma, podem causar efeitos tóxicos nos diferentes organismos e no ecossistema. Assim, os metais pesados como cádmio, cobre e chumbo sendo continuamente lançados no ambiente aquático, por via natural ou por via antrópica podem influir negativamente nos ambientes naturais vindo a interagir em áreas de cultivo. Como as algas representam um importante elo na cadeia alimentar, podem representar vias críticas de transferência desses elementos para o homem. A proposta de analisar a interação de cádmio, cobre e chumbo com as macroalgas *G. floridanum*, *H. musciformis* e *P. flagellifera* permitiu um aprofundamento dos estudos referentes ao potencial efeito deletério destes metais sobre os organismos aquáticos. Desta forma, verificou-se as alterações morfológicas e fisiológicas decorrentes da presença destes metais. O presente trabalho poderá servir também como parâmetro para possíveis cultivos destas algas, bem como fonte de dados para outras pesquisas relacionadas à ultraestrutura e a fisiologia de algas quando tratadas com metais, assim, servindo de subsídios para produção de relatórios de impacto ambiental.

O presente trabalho foi motivado pela hipótese de que há diferenças nas respostas ultraestruturais e fisiológicas entre *G. floridanum*, *H. musciformis* e *P. flagellifera* *in vitro* na presença de cádmio, cobre e chumbo em diferentes concentrações no meio de cultura Von Stosch.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivos Gerais.

Avaliar os possíveis efeitos *in vitro* de diferentes concentrações dos metais pesados cádmio, cobre e chumbo na fisiologia, morfologia e organização celular das macroalgas *G. floridanum*, *H. musciformis* e *P. flagellifera*.

3.2 Objetivos Específicos.

Verificar a interferência dos metais na taxa de crescimento das três espécies estudadas;

Verificar a bioabsorção de *G. floridanum* e *H. musciformis*;

Analisar as alterações morfológicas nos cloroplastos de *G. floridanum* através de microscopia confocal;

Analisar, através de métodos citoquímicos, a organização celular das espécies tratadas com os diferentes metais pesados;

Identificar as possíveis alterações ultraestruturais nas células das amostras tratadas com o cádmio, cobre e chumbo;

Detectar a presença dos metais pesados na superfície das amostras por meio de análise de raios-X no microscópio eletrônico de varredura (EDS);

Avaliar a eficiência fotossintética de *H. musciformis* com as amostras controle e tratadas com chumbo e cobre através do Fluorímetro com pulso de Amplitude Modulada (PAM);

Analisar quantitativamente as possíveis alterações nos pigmentos fotossintetizantes, clorofila *a*, ficobiliproteínas e carotenoides nas amostras das três espécies estudadas tratadas com os metais pesados;

Analisar quantitativamente as possíveis alterações na quantidade de flavonóides totais nas amostras de *G. floridanum* e *H. musciformis* tratadas com metais;

Analisar quantitativamente a quantidade de fenólicos e proteínas totais nas amostras de *H. musciformis* tratadas com metais;

Avaliar a viabilidade celular de *P. flagellifera* das amostras tratadas com os metais pesados e amostras controle.

4. METODOLOGIA.

4.1. Coleta e processamento de *G. floridanum*, *H. musciformis* e *P. flagellifera*.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LaBCeV), Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para a realização dos bioensaios com cádmio, cobre e chumbo foram coletadas amostras de *G. floridanum* na praia do Sambaqui (Janeiro/Fevereiro, 2012), Florianópolis-SC (27°29' 18.8'' S e 48°32' 18.9'' W), *H. musciformis* na praia de Ponta das Canas (Janeiro/Fevereiro, 2013) Florianópolis-SC (27°23'34'' S e 48°26'11'' W) e *P. flagellifera* na Prainha da Barra da Lagoa (Dezembro/Fevereiro, 2013/2014), Florianópolis-SC (27°57'38'' S e 48°41'98'' W). Todas as amostras de algas foram transportadas em recipientes plásticos contendo água do mar, posteriormente colocados em sacos pretos evitando a ocorrência da fotooxidação até a chegada ao LaBCeV (BEG-CCB-UFSC), onde os talos foram lavados com água do mar filtrada e esterilizada, e removidos os contaminantes.

4.2. Condições de cultivo.

No laboratório, as algas foram aclimatadas durante sete dias. Para os procedimentos laboratoriais, a água do mar utilizada foi esterilizada em sistema de passagem em radiação ultravioleta. Após a esterilização esta água foi enriquecida com o meio von Stosch (Edwards 1970) sem EDTA na proporção de 2mL de meio para cada 500mL de água do mar. A solução padrão de von Stosh é preparado com NaNO₃ (10,625g), Na₂HPO₄ 12H₂O (2,0112g), FeSO₄ 7H₂O (0,1738g), MnCl₂ 4H₂O (0,0248g), Tiamina (25mL), Biotina (1mL) e Cianocobalamina (1mL) completando 2L com água destilada. O EDTA é colocado 0,93g nesta solução, porém não foi utilizado por quelar metais e interferir nos experimentos. Com salinidade de 34 ups (unidades padrão de salinidade). Neste período de aclimação, as algas foram cultivadas em frascos erlenmeyer de 500 mL, cada um contendo 0,5 g da alga em estudo, sendo quatro réplicas para cada tratamento, durante todos os dias com irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) ao dia de 80 μm fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Li-cor light meter 250, *Estados Unidos da América*, USA). A

temperatura de 24 ° C (± 2 ° C) e o fotoperíodo de 12 horas, sendo que o período de luz iniciou-se às 8 horas da manhã, com aeração contínua.

4.3. Teste de letalidade com cádmio, cobre e chumbo.

Após a aclimação, foram isolados porções apicais de *H. musciformis* e *P. flagellifera* utilizadas em cada um dos experimentos. Para cada tratamento, foram pesados cerca de 0,5g de alga por frasco contendo 500mL de água do mar nas condições descritas anteriormente. A letalidade foi avaliada durante 7 dias, com cobre e chumbo com a alga *H. musciformis*, nas concentrações de 0,1 a 12,5 mg.Kg⁻¹ e chumbo para *P. flagellifera*, nas concentrações de 0,1 a 25 mg.Kg⁻¹. Amostras controle foram cultivadas em igual período.

4.4. Avaliação dos efeitos com: cádmio, cobre e chumbo.

O experimento foi feito com cada um dos três metais isoladamente, nas concentrações de 50 e 100 µM para Cd (~ a 0,018 e 0,037 mg.Kg⁻¹), Cu (~ a 0,007 e 0,013 mg.Kg⁻¹) e Pb (~ a 0,028 e 0,057 mg.Kg⁻¹), com *G. floridanum* (concentrações conforme a literatura). Após o teste de letalidade realizado com *H. musciformis* e *P. flagellifera*, realizou-se o experimento com os seguintes tratamentos: controle, 0,05 e 0,1 mg.Kg⁻¹ de Cu e 3,5 e 7 mg.Kg⁻¹ de Pb para *H. musciformis* e tratamento controle e os tratamentos com 0,5, 2,5, 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb para *P. flagellifera* durante 7 dias de tratamento, quatro réplicas para cada tratamento. Estes tratamentos diferentes para cada espécie foram utilizados devido à existência de experimentos já realizados com cádmio para *H. musciformis* (Bouzon *et al.* 2013) e a finalização de um trabalho com Cd para *P. flagellifera* por outros integrantes do Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LaBCeV-CCB/UFSC).

4.5. Taxas de crescimento (TC).

O efeito das concentrações dos metais pesados no crescimento dos segmentos apicais de *H. musciformis*, *G. floridanum* e *P. flagellifera* foi avaliado através de medidas de peso da matéria fresca após o período de tratamento. As taxas de crescimento foram obtidas a partir do aumento da massa fresca e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, sendo calculada segundo a seguinte equação:

$$TC (\% \text{ dia}^{-1}) = [(Pf / Pi)^{1/t} - 1] \times 100$$
 (Penniman *et al.* 1986) onde:

Pi = peso fresco inicial em gramas, Pf = peso fresco em gramas após 14 dias,
t = tempo interno em dias.

4.6. Concentração de Cd, Cu e Pb em amostras de água do mar e nas algas.

As concentrações de Cd, Cu e Pb em amostras de água e em amostras de *G. floridanum* bem como concentrações de Cu e Pb nas amostras de *H. musciformis* (inicial e final do experimento) foram analisados por espectrometria de emissão atômica por plasma de indutividade acoplada (ICP-AES, Arcos de M / s. Spectro, Alemanha) seguindo metodologia aplicada por Felix *et al.* (2014), utilizando as seguintes ondas de análises: Cd 214,438 nm, Cu 324,754 nm e Pb 220,353 nm vista-axial, com um limite de detecção de 0,001 mg.Kg⁻¹ para Cd, Cu e Pb. Após 7 dias de exposição ao Cd, Cu e Pb, amostras de algas (300 mg) foram lavadas em água destilada, liofilizadas a 65 ° C e digeridas em ácido nítrico. As amostras de água (50 mL) também foram digeridas usando ácido nítrico concentrado. Absorção total de metal foi expresso em %, calculado através de (mg de Cd / Cu e Pb em 500 ml de água por mg de Cd em 750 mg de algas frescas). O Fator de bioconcentração (BCF) foi calculado como a concentração restante de metal e a biomassa vegetal em peso seco (expresso em mg.Kg⁻¹) divididos pela concentração inicial de metal adicionado no meio de cultura. Todas as análises foram realizadas em quadruplicatas.

4.7. Processamento para análises em microscópio confocal.

As amostras de *G. floridanum*, tratadas sem metais e com cádmio, cobre e chumbo nas concentrações de 50 e 100 µM, após os sete dias de tratamento, foram cortadas em seções de 5 milímetros, seguidas de montagem em lâminas e seladas com esmalte de unha incolor. Em seguida foram analisadas em um microscópio de varredura a laser confocal Leica TCS (SP-5, Wetzlar, Alemanha). A lente objetiva Leica HCX PL APO lambda 63X /1.4-0.6 para imersão em óleo foi montada no microscópio de fluorescência invertido. A autofluorescência do cloroplasto foi observada ao comprimento de onda 488 nm com a excitação do comprimento de onda do laser de argônio de 440, 488 e 514nm (Hepler e Gunning 1998). O programa LAS-AF Lite (Leica) também foi utilizado para o processamento final do imagens confocal.

4.8. Processamento para análises em microscópio de luz.

As amostras de *G. floridanum*, tratamentos controle e tratamentos com cádmio, cobre e chumbo de 50 e 100 μM ; as amostras *H. musciformis* nos tratamentos controle e com 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} de cobre; 3,5 e 7 mg.Kg^{-1} de chumbo foram processadas para análises citoquímicas. Fragmentos de aproximadamente 3mm foram fixados em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato (0,2M, pH 7,2). Após a fixação, foram lavadas em tampão fosfato (Bouzon 1993). Em seguida as amostras foram desidratadas em uma série de soluções aquosas de etanol. Logo após a desidratação, seguiu-se a pré infiltração com misturas de etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA) nas proporção 1:1. Posteriormente os materiais foram infiltrados em resina pura. Terminada a infiltração, realizou-se a inclusão com a mesma resina, com adição de polimerizador, em histomoldes (Arnold *et al.* 1975, modificado).

Ao término do processo de inclusão, as amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo de parafina modelo LEICA RM 2135, com navalhas de tungstênio, com espessura de 4 μm , coletadas com pinça e distentidos nas lâminas de vidro com gotas de água destilada e secos a 37° em placa quente por 30 minutos.

O ácido periódico de Schiff (PAS) foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose) nas células das amostras de *G. floridanum* e *H. musciformis*. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% e coradas com reativo de Schiff. Foram então, lavadas em água corrente, secos ao ar e montados com bálsamo do Canadá (Gahan, 1984).

Após a coloração, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América ind.).

4.9. Processamento para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET).

Para a análise no MET, porções das amostras de todos os tratamentos e controles das algas *G. floridanum* e *H. musciformis* foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 %, sacarose 0.2 M, tamponada

com cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Seguida por lavagens no mesmo tampão e sacarose em concentrações decrescentes. Depois das lavagens os espécimes foram pós-fixados em OsO_4 (tetróxido de ósmio) a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 (Pueschel 1979; Bouzon *et al.* 2000). Posteriormente, o material foi lavado em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 e desidratado em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona, a última série de acetona (100%) trocada três vezes. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com resina Spurr (Spurr 1969). Logo após a infiltração, o material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70° C por 24 h. As secções ultrafinas foram cortadas no ultramicrotomo Leica UC7/EMKMR3, com navalha de diamante, e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo conforme os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram então observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL (JEM) 1011 (MET) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC).

4.10. Processamento para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

As amostras de *G. floridanum* os tratamentos controle e os tratamentos com 50 e 100 μM de cádmio, cobre e chumbo; as amostras *H. musciformis* tratadas sem metais e os tratamentos com 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} de cobre; 3,5 e 7 mg.Kg^{-1} de chumbo e *P. flagellifera* tratadas sem metais e os tratamentos com 0,5, 2,5 e 12,5 mg.Kg^{-1} de chumbo foram processadas para análises no MEV. As amostras do controle e dos diferentes tratamentos foram previamente lavadas com água destilada para retirada de metais depositados na superfície e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % tamponada com cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e sacarose 0,2M, durante 4h seguida por lavagens em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2.

O material foi desidratado em uma série etanólica aquosa de concentrações crescentes, sendo as últimas trocas em etanol a 100%. A desidratação foi completada no ponto crítico, modelo Leica EMCD-030 (LCME). Depois de seco, os materiais foram colados nos suportes de alumínio e metalizados (Metalizador Blatec, CED 030). Foram observados e fotografados em microscópio de varredura modelo Jeol 6390 LV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME da UFSC. Para a detecção dos metais nas células, foi utilizado o detector

EDS-Thermoelectro, aparelho acoplado ao microscópio de varredura modelo Jeol 6390 LV.

4.11. Medida da eficiência fotossintética.

Os experimentos com *H. musciformis* foram acompanhados por medidas de fluorescência da clorofila *a* utilizando um fluorímetro de pulso amplitude modulada (Diving-PAM fluorometer subaquático; Walz, Effeltrich, Alemanha). As configurações ideais do PAM foram previamente avaliadas para *H. musciformis* em condições de laboratório, e eles foram os seguintes: sat pulso int 9 (4000 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a duração 0.8 s, gain 3, damping 3 e ETR-F 1,00. Após as medições de Rendimento (Sat Pulso), as amostras de algas foram aclimatadas ao escuro por 10 min, seguido pela aplicação de curvas rápidas de luz (CRL). Estas curvas foram realizadas com 9 diferentes irradiâncias luz actínica: 0, 70, 115, 160, 250, 340, 550, 841, e 1180 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após aclimação ao escuro, o primeiro pulso de saturação permitiu o cálculo de fluorescência basal da clorofila (F_0) e fluorescência máxima da clorofila (F_m). Estes foram seguidos por aumento luzes actínicas, durante 20 s cada. Depois de cada luz actínica, pulsos foram aplicados até a saturação, permitindo o cálculo de F e F_m' . Rendimento quântico foi calculada como $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$. Rendimento efetivo quantum foi obtido como $Y(II) = (F_m' - F) / F_m'$. Fator de absorção (FA) foram calculados, que é a relação entre a radiação absorvida por algas e o total de fluxo de radiação incidente, na sequência da fórmula $FA = 1 - (E_t / E_0)$, onde E_t é a quantidade de irradiação transmitida por seções talos e E_0 é a irradiância inicial. Valores ETR_{real} onde calculados com a seguinte equação: $ETR_{\text{real}} = Y(II) * PAR * \text{Absortância} * 0,15$. Curvas rápidas de luz (CRL) permitiram a obtenção de parâmetros de ajuste de curvas, como a eficiência fotossintética (αETR) e a taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max}). Estes valores foram obtidos por CRLs com *fitting* da equação de Platt (1980). Outros parâmetros foram calculados como dissipação não-fotoquímica (NO) (Maxwel e Johnson 2000) e energia dissipada regulada ($Y(NPQ)$). O rendimento quântico foi calculado a partir da fórmula $[(F_m - F_0) / F_m]$. Integral Definida (DI) foi calculada com $Y(II)$, $Y(NO)$ e $Y(NPQ)$.

4.12. Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes.

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, utilizaram-se amostras de *G. floridanum* nos tratamentos controle e tratamentos com 50 e 100 μM de cádmio, cobre e chumbo; as amostras *H. musciformis* controle e tratadas com 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} de cobre, 0, 3,5 e 7 mg.Kg^{-1} de chumbo e *P. flagellifera*, amostras controle e tratadas com 0,5, 2,5 e 12,5 mg.Kg^{-1} de chumbo, estas amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido. As extrações foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Itacorubi-Florianópolis). Por fim, as análises foram realizadas em quadruplicatas.

4.12.1. Extração e dosagem de clorofila *a*.

A extração de clorofila *a* dos talos foi realizada utilizando o método de Hiscox e Israelstam (1979). A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 250 mg de massa fresca para cada repetição, acrescidos 1mL de dimetilsulfoxido (DMSO, Merck, Darmstadt, RFA) e a clorofila foi extraída na solução sem macerar (ápices foram cortados) a 65° C por 30 minutos. O extrato líquido foi completado o volume para 3ml da solução de DMSO. Todo o processo foi realizado no escuro a 4°C.

A dosagem da concentração de clorofila *a* foi realizada com os 3ml das amostras e transferidas para cubetas de vidro de 10mm, para leitura em espectrofotômetro Shimadzu 2301. A calibragem do aparelho foi realizada com solução de DMSO. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-se as absorbâncias 488,5, 614, 651 e 665nm (UV- visível) com varredura de 1 segundo.

A determinação da concentração de clorofila *a* foi feita utilizando-se a equação descrita por Wellburn (1994): $\text{Cl } a = 13,8 A_{665}$. Na fórmula descrita, a unidade foi $\mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos foram convertidos em $\mu\text{g/g}$ de massa fresca, multiplicando-se pelo volume do solvente utilizado e, posteriormente, dividido pela biomassa fresca da amostra.

4.12.2. Extração e dosagem das ficobiliproteínas.

A extração das ficobiliproteínas foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 250 mg de massa fresca para cada repetição. Todo o processo foi realizado no escuro a 4° C.

As amostras, congelado em nitrogênio líquido, foram trituradas até a formação de um pó fino em almofariz. O pó foi diluído em um total de 4ml de tampão fosfato, pH 5,5. A solução foi centrifugada a 4000 g por 20 minutos. O sobrenadante contendo as ficobiliproteínas foi retirado e mantido em tubos de ensaio vedados, até a leitura em espectrofotômetro. A calibragem do aparelho foi realizada com soluções de tampão de fosfato. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-os no intervalo de 190 a 750 nm (UV – visível) com varredura de 1 segundo.

A concentração de ficobiliproteínas foi determinada usando as equações descritas por Kursar *et al.* (1983): AFC (aloficocianina) = $181,3 A_{651} - 22,3 A_{614}$; FC (ficocianina) = $151,1 A_{614} - 99,1 A_{651}$; FE (ficoeretrina) = $155,8 A_{488,5} - 40,0 A_{614} - 10,5 A_{651}$. As unidades descritas nestas fórmulas é em $\mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos foram convertidos em $\mu\text{g/g}$ de massa fresca, multiplicando-se pelo volume do solvente utilizado e, posteriormente, dividido pela biomassa fresca da amostra.

4.12.3. Extração e dosagem de carotenóides..

Os carotenóides foram extraídos a partir de 1 g de amostras frescas congeladas de *G. floridanum*, tratadas sem metais e os tratamentos de 50 e 100 μM de cádmio, cobre e chumbo; as amostras *H. musciformis* tratadas sem metais e os tratamentos com 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} de cobre; 3,5 e 7 mg.Kg^{-1} de chumbo e *P. flagellifera* tratadas sem metais e os tratamentos com 0,5, 2,5 e 12,5 mg.Kg^{-1} de chumbo, utilizando hexano: acetona (1:1, v/v) contendo 100 mg.L^{-1} de 1-terc-butil-hidroxitolueno (BHT). Os homogeneizados foram filtrados através de uma membrana de celulose para remover as partículas, e o solvente orgânico foi evaporado sob fluxo de N_2 . Os resíduos foram dissolvidos em hexano (3 mL) e carotenóides foram determinados por meio de UV-visível Espectrofotometria (SF200ADV, Bel), por medida de absorbância a 450nm (3 repetições por amostra) (Multireader Infinite M200, TECAN). A quantificação de carotenoide foi baseada na curva padrão de β -caroteno ($1\text{-}50 \text{ ng mL}^{-1}$, $y = 0.055x$; $r^2 = 0,999$).

4.13. Extração e dosagem de flavonóides.

Para esta análise, utilizaram-se as amostras de *G. floridanum*, tratadas sem metais e os tratamentos de 50 e 100 μM de cádmio, cobre e chumbo; as amostras *H. musciformis* tratadas sem metais e os tratamentos com 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} de cobre; 3,5 e 7 mg.Kg^{-1} de chumbo. Os

flavonóides foram extraídos de 1g de amostras frescas congeladas ($n = 4$) para cada tratamento, utilizando 10 mL de 80% de metanol aquoso. Os homogenatos foram filtrados através de uma membrana de celulose para remover as partículas, uma alíquota (2 ml) do extrato foi centrifugado durante 5 min total de 4000 rpm. O montante de flavonóides foi determinado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio (Zacarias *et al.* 2007). A seguir, uma alíquota de 0,5 mL de extrato foi adicionado a 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de 2% de hexa-hidrato de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Após incubação à temperatura ambiente durante 1 hora, foi medida a absorbância da mistura a 420 nm (Hitachi, modelo 100-20). A quantificação dos flavonóides foi baseada na curva padrão de quercetina ($10\text{-}200 \text{ ng mL}^{-1}$, $y = 0.010x$; $r^2 = 0,999$).

4.14. Extração e dosagem de compostos fenólicos totais.

Os compostos Fenólicos Totais foram extraídos a partir de 1 g de amostras congeladas frescas de *H. musciformis* ($n = 4$) para cada tratamento (de Cu e Pb) após 7 dias de cultura. As amostras de *H. musciformis* foram trituradas com misturador (0,5 g) em 5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,4, com 0,2% de TRITON X-100. Depois disso, os homogenatos foram centrifugados a 3000 g durante 20 min, e o sobrenadante, foram acrescidos de 50 mL de reagente de Folin e 500 mL de carbonato de sódio a 15%. Os homogenatos foram então encubados a 37°C por 30 min para posterior leitura espectrofotométrica, absorbância de 760 nm, de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, ALPHA (1989). A quantificação de compostos fenólicos totais foi baseada na curva padrão ($y = 0,068 + 0.0671x$; $r^2 = 0,995$) obtidos usando fenol (Sigma, EUA).

4.15. Proteínas totais.

Amostras de *H. musciformis* foram trituradas com mixer (0,5 g) em 5 mL do reagente de proteína Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado com Azul Brilhante de Coomassie (100 mg), que foi dissolvido em 50 ml de etanol 95%. A esta solução foi adicionado 100 ml de ácido fosfórico 85%. A solução resultante foi diluída para um volume final de 1 litro. As concentrações finais de reagente eram de 0,01% de Azul Brilhante de Coomassie G-250, 4,7% de etanol, e 8,5% de ácido fosfórico. Os homogenatos foram centrifugados a 3000 g por 20 min. O conteúdo sobrenadante contendo as proteínas totais foram quantificadas

com espectrofotômetro, de acordo com Bradford (1976), com a curva padrão ($y = 0.00022x$; $r^2 = 0.997$), utilizando albumina (Sigma, USA) como proteína padrão.

4.16. Viabilidade celular (MTT).

A análise de viabilidade celular utilizada para as amostras de *P. flagellifera* baseou-se na redução de brometo 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) em formazan púrpura pela desidrogenase mitocondrial das células vivas (Mosmann 1983; Freimoser *et al.* 1999).

A concentração de formazan foi determinada espectrofotometricamente, uma vez que esta é proporcional a quantidade de mitocôndrias ativas e, por consequência, para o número de células vivas. Após a exposição dos segmentos apicais de *P. flagellifera* ao Pb (0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹ durante 4, 8 e 12 dias (1g de alga para cada Balão de Erlenmeyer de 500mL), os segmentos de algas (6 mg de cada amostra analisada) foram cuidadosamente lavados com água do mar esterilizada, pesados e colocados em um tubo de ensaio contendo 0,17 g L⁻¹ de MTT (solução mãe - foi utilizado 0,017g de MTT em 1ml de PBS) e água do mar esterilizada (3 mL de volume final). Os tubos de ensaio foram mantidos a 37 ° C durante 3 h, sob agitação, o que permitiu a reação com o MTT. Os fragmentos de algas foram então lavados em água destilada, transferidos para um tubo de teste contendo 1,0 mL de dimetil sulfoxido (DMSO) para extração da formazan púrpura. A leitura da absorbância (quadruplicatas para cada tratamento) a 570 nm, foram feitas com alíquotas de 250 µL desta solução utilizando uma multileitora de microplacas (Infinite M200, Tecan) no Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB-CCB-UFSC).

4.17. Tratamento da vidraria e materiais de descarte após a sua utilização.

Depois de utilizada toda a vidraria, esta ficou submersa em HNO₃ a 10% em overnight. Após este processo, ficou submersa em solução de hipoclorito e detergente neutro por duas horas, enxaguada por dez vezes em água e uma vez em água destilada. Por fim, foram esterilizados em estufa modelo J-prolab SE-4 por duas horas a 180°C.

Toda a vidraria deste experimento foi separada das demais vidrarias do laboratório. Os materiais descartáveis e água que tiveram

contato com os metais pesados foram enviados para empresa de descarte de materiais tóxicos da UFSC.

4.18. Análise e interpretação de dados.

Os dados dos experimentos com *G. floridanum* e *H. musciformis* foram submetidos à Análise da variância unifatorial ANOVA enquanto os dados de *P. palisada* foram submetidos à Análise da variância bifatorial ANOVA, seguida do teste *a posteriori* de Tukey (*G. floridanum*) ou Newman-Keuls (*H. musciformis* e *P. palisada*) para verificar as significâncias das diferenças ($p < 0,05$) entre as taxas de crescimento, pigmentos fotossintetizantes e eficiência fotossintética para os tratamentos com diferentes concentrações dos metais pesados em estudo e seus respectivos controles. Todas as análises foram realizadas no Programa *Statistica* (versão 10.0).

4.19. Quadro resumo das metodologias.

Tabela 1 – Metodologias aplicadas a cada alga em estudo.

	<i>G. floridanum</i>	<i>H. musciformis</i>	<i>P. flagellifera</i>
Letalidade	X	X	
Taxas de crescimento	X	X	X
Bioacumulação	X	X	
Confocal	X		
ML (PAS)	X	X	
MET	X	X	
MEV	X	X	X
PAM		X	
Clorofila <i>a</i>	X	X	X
Ficobiliproteínas	X	X	X
Carotenóides	X	X	X
Flavonóides	X	X	
Fenólicos		X	
Proteínas totais		X	
Viabilidade celular			X

5. CAPÍTULO I: Bioabsorção de cádmio, cobre e chumbo pela macroalga vermelha *Gelidium floridanum*: Respostas fisiológicas e ultraestruturais.



Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidium floridanum*: Physiological responses and ultrastructure features



Rodrigo W. dos Santos^{a,1}, Éder C. Schmidt^{b,a,1}, Marthiellen R. de L. Felix^a, Luz K. Polo^a, Marianne Kreusch^c, Debora T. Pereira^c, Giulia B. Costa^a, Carmen Simioni^a, Fungyi Chow^d, Fernanda Ramlov^e, Marcelo Maraschin^e, Zenilda L. Bouzon^f

^a Plant Cell Biology Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil

^b Postdoctoral Researcher of Postgraduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476 Florianópolis, SC, Brazil

^c Scientific Initiation-PRONEX/CNPq, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil

^d Institute of Bioscience, Department of Botany, University of São Paulo, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

^e Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil

^f Central Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2013

Received in revised form

20 February 2014

Accepted 24 February 2014

Available online 7 May 2014

Keywords:

Gelidium floridanum

Ultrastructure

Chloroplasts

Cadmium

Lead

Copper

ABSTRACT

Heavy metals, such as lead, copper, cadmium, zinc, and nickel, are among the most common pollutants found in both industrial and urban effluents. High concentrations of these metals cause severe toxic effects, especially to organisms living in the aquatic ecosystem. Cadmium (Cd), lead (Pb) and copper (Cu) are the heavy metals most frequently implicated as environmental contaminants, and they have been shown to affect development, growth, photosynthesis and respiration, and morphological cell organization in seaweeds. This paper aimed to evaluate the effects of 50 µM and 100 µM of Cd, Pb and Cu on growth rates, photosynthetic pigments, biochemical parameters and ultrastructure in *Gelidium floridanum*. To accomplish this, apical segments of *G. floridanum* were individually exposed to the respective heavy metals over a period of 7 days. Plants exposed to Cd, Cu and Pb showed discoloration of thallus pigmentation, chloroplast alteration, especially degeneration of thylakoids, and decrease in photosynthetic pigments, such as chlorophyll *a* and phycoerythrin, in samples treated with Cd and Cu. Moreover, cell wall thickness and the volume of plastoglobuli increased. X-ray microanalysis detected Cd, Cu and Pb absorption in the cell wall. The results indicate that Cd, Pb and Cu negatively affect metabolic performance and cell ultrastructure in *G. floridanum* and that Cu was more toxic than either Pb or Cd.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.021>

5.1. Introdução.

Nos últimos anos, o aumento da população humana e o desenvolvimento industrial promoveram um aumento de contaminantes nos sistemas aquáticos (Rochetta *et al.* 2007). Por consequência, estudos sobre os efeitos de metais pesados em organismos aquáticos são muito importantes, particularmente se eles focam poluição industrial ou urbana. A contaminação de águas costeiras com elementos traço de metais através de vias naturais ou antropogênicas tem sido um grave problema (Mamboya *et al.* 1999).

Metais pesados, como cádmio (Cd), cobre (Cu) e chumbo (Pb), estão entre os poluentes mais comuns em efluentes industriais e urbanos (Sheng *et al.* 2004). Em pequenas concentrações, alguns metais pesados (Cu, Zn, Ni e Mn) são elementos traço essenciais para organismos fotossintéticos; entretanto, em altas concentrações, estes metais causam efeitos tóxicos graves (Hu *et al.* 1996).

Os metais pesados afetam todos os organismos, especialmente os de ecossistemas aquáticos, em muitas vias metabólicas importantes. Vários estudos têm mostrado efeitos como decréscimo de taxa de crescimento de macroalgas (Mamboya *et al.* 1999), mudanças nos montantes de pigmentos fotossintetizantes (Bouzon *et al.* 2012b; Rochetta *et al.* 2007), e eficiência fotossintética (Bouzon *et al.* 2012b; Mamboya *et al.* 1999), bem como o aumento nas proteínas totais e no conteúdo lipídico (Rochetta *et al.* 2007). Alguns estudos mostram mudanças na ultraestrutura de algas vermelhas *Audouinella savina* (F.S. Collins) Woelkerling (Talarico 2002), *Ceramium ciliatum* (J. Ellis) Ducluzeau (Diannelidis e Delivopoulos 1997), *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Bouzon *et al.* 2012b), e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Santos *et al.* 2012; 2013); as algas verdes *Dunaliella minuta* Lerche (Visviki e Rachlin 1992) e *Enteromorpha flexuosa* (Wulfen) J. Agardh (Andrade *et al.* 2004); a euglenóide fotossintética *Euglena gracilis* Klebs (Rochetta *et al.* 2007); e a alga parda *Padina gymnospora* (Kützinger) Sonde (Andrade *et al.* 2002).

O aumento gradual do despejo de metais pesados e outros poluentes diretamente no ambiente expõe os organismos marinhos a diferentes níveis de toxicidade, afetando o desenvolvimento e promovendo o decréscimo da taxa de crescimento e da biodiversidade (Torres *et al.* 2008). Os metais pesados em altas concentrações são poluentes não biodegradáveis (Mallick e Rai 2001) e podem ser

acumulados em macroalgas, promovendo desta forma o decréscimo das taxas de crescimento (Amado-Filho *et al.* 1997).

O cádmio é um dos metais pesados que mais frequentemente contaminam o meio ambiente. Este metal é utilizado na confecção de vários produtos como: baterias, chips, pigmentos, receptores de televisores e semicondutores (Hashim e Chu 2004; Hu *et al.* 1996). Este metal não faz parte, naturalmente, de moléculas orgânicas presentes em algas (Visvik e Rachlin 1992), mas, o cádmio pode ligar-se a grupamentos sulfatados, bem como metaloproteínas e metaloenzimas neutralizando assim suas funções (Pinto *et al.* 2003). Por estes motivos, o cádmio pode ser associado com o decréscimo na fotossíntese e na taxa de crescimento de algas marinhas (Diannelidis e Delivopoulos 1997; Visvik e Rachlin 1992).

O chumbo é considerando um dos maiores contaminantes ambientais de origem antrópica (Eick *et al.* 1999). E encontra-se presente no ambiente devidos às atividades agrícolas e industriais, como a mineração, a queima de carvão, efluentes de fabricação de baterias, escapamento de automóveis, metalização e acabamento em objetos metálicos, fertilizantes, pesticidas e aditivos em pigmentos e gasolina. Este metal não é essencial para os processos biológicos mas pode ser absorvido e acumulado em diferentes partes dos organismos (Sharma e Dubey 2005).

Por outro lado, o cobre é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento de vegetais. Este metal é um elemento estrutural de proteínas e participa no transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração mitocondrial, estresse oxidativo, metabolismo da parede celular, transcrição (Yruela 2005). Entretanto, em grandes quantidades, pode apresentar papel inibidor de importantes processos celulares como transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração celular. O sistema de transporte de membranas parece ser um dos alvos deste metal, exercendo um papel importante nos processos de toxicidade (Yruela 2005). Em ambientes aquáticos, várias fontes de Cu, incluindo resíduos industriais e domésticos, práticas agrícolas, drenagem marinha, pesticidas à base de cobre e tintas antiincrustantes levaram a um claro aumento na concentração deste metal (Callow e Callow 2002).

Gelidium floridanum é distribuída ao longo da costa brasileira do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul. Esta espécie produz ágar com várias propriedades, gelificante e bacteriológicas (Armisen *et al.* 1995). As espécies de *Gelidium* J.V. Lamouroux são conhecidas por produzirem ágar de alta qualidade que possui baixo teor de sulfato o que confere um

preço alto por este ágar (Souza-Pinto *et al.* 1999). Considerando os efeitos dos metais pesados em macroalgas o presente trabalho busca avaliar e comparar os efeitos biológicos de três diferentes metais (cádmio, cobre e chumbo) nas respostas fisiológicas e ultraestruturais, na bioabsorção de metais, características morfológicas, pigmentos fotossintéticos, conteúdo de flavonóides, taxa de crescimento na macroalga vermelha *G. floridanum*. Estes estudos podem servir de suporte para relatórios de impacto ambiental e subsidiar programas de monitoramento ambiental.

5.2. Resultados.

5.2.1. Absorção de cádmio, cobre e chumbo.

Nas análises de absorção de Cd, Cu e Pb não foram detectados a presença destes metais nas amostras controle (Tabela 1). Entretanto, amostras tratadas com Cd mostraram uma porcentagem de absorção de 3,48% para tratamento com 50 μM e 1,92% para o tratamento com 100 μM . Porém, comparativamente o cobre apresentou uma maior porcentagem de absorção 68,53% para o tratamento de 50 μM e 67,18% para o tratamento de 100 μM . Enquanto que as amostras tratadas com chumbo mostraram uma absorção de 32,86% para o tratamento 50 μM e 27,73% para o tratamento de 100 μM . O fator de bioconcentração foi de 1500 para as amostras tratadas com cobre (Tabela 1). Também foi verificado um alto fator de bioconcentração para as amostras tratadas com chumbo.

Tabela 2 – Bioabsorção de metais pesados de *G. floridanum* cultivados com 50 μM e 100 μM de Cd, Cu e Pb durante um período de 7 dias. Dados são médias \pm Desvio Padrão (n = 4). Letras indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Tabela extraída de Santos *et al.* (2014).

Tratamento	% de absorção	Fator de Bioconcentração
Controle	0,00 ^f	0,00 ^g
50 μM Cd	3,48 ^d \pm 0,03	86,95 ^e \pm 0,15
100 μM Cd	1,92 ^e \pm 0,18	47,92 ^f \pm 0,35
50 μM Cu	68,53 ^a \pm 3,05	1713,30 ^a \pm 23,47
100 μM Cu	67,18 ^a \pm 4,2	1679,42 ^b \pm 19,56
50 μM Pb	32,86 ^b \pm 0,83	821,57 ^c \pm 1,38
100 μM Pb	27,73 ^c \pm 0,75	693,24 ^d \pm 2,54

5.2.2. Taxas de crescimento (TC).

Após sete dias de experimento, os tratamentos com cádmio, cobre e chumbo de *G. floridanum* mostraram mudanças significativas na morfologia como redução da ramificação, descoloração e necrose quando comparados com as amostras controle (Fig. 1). O branqueamento e a despigmentação, que não foram observadas nas amostras controle (Fig. 1A) ficaram evidente nas amostras tratadas com 50 μM Cd (Fig. 1B), 100 μM Cd (Fig. 1C), 50 μM Cu (Fig. 1D), 100 μM Cu (Fig. 1E), and 100 μM Pb (Fig. 1G). Entretanto, o tratamento com 50 μM de Pb não ocasionou despigmentação (Fig. 1F) além de mostrar cor semelhante com as das amostras controle (Fig. 1A).

As amostras tratadas com cádmio, cobre (50 e 100 μM) e chumbo (100 μM), tiveram quedas significativas nas TC quando comparadas as amostras controle, exceto, as amostras tratadas com 50 μM de chumbo que apresentaram uma menor redução nas TC (Tabela 2). As amostras controle apresentaram um aumento na taxa de crescimento em 1,48 %. dia^{-1} com a cor vermelha natural e o aumento de formação de ramos pigmentados até o final do experimento (Fig. 1A).

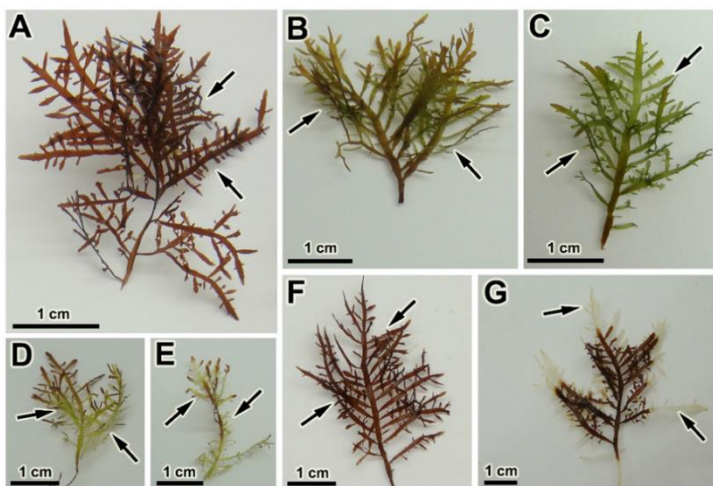


Figura 1 – Aspecto morfológico de *G. floridanum* das amostras controle após 7 dias de cultivo e amostras expostas às diferentes concentrações de Cd, Cu e Pb. A: Segmento apical do controle. Note a cor vermelha e a grande quantidade de ramificações (setas). B: Segmento apical cultivado com 50 µM de Cd. Observe a redução de ramificações laterais e branqueamento (seta). C: Segmento apical cultivado com 100 µM de Cd. Observe a redução mais intensa de ramificações laterais e redução na pigmentação (seta). D: Segmento apical cultivado com 50 µM de Cu. Observe a extrema redução nas ramificações laterais e o branqueamento (seta). E: Segmento apical cultivado com 100 µM de Cu. Note a forte perda na ramificação e na coloração avermelhada (seta). F: Segmento apical cultivado com 50 µM de Pb sem alterações visíveis. G: Segmento apical cultivado com 100 µM de Pb. Note branqueamento apical e necrose (setas). Figura extraída de Santos *et al.* (2014).

Tabela 3 – Taxa de crescimento (TC) de *G. floridanum* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de Cd, Cu e Pb. Dados são médias \pm Desvio Padrão (n = 4). Letras indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Tabela extraída de Santos *et al.* (2014).

Tratamentos	Taxas de crescimento (%.dia ⁻¹)
Controle	1,48 ^a \pm 0,32
50 µM Cd	0,55 ^b \pm 0,42
100 µM Cd	0,27 ^{bc} \pm 0,42
50 µM Cu	0,21 ^b \pm 0,23
100 µM Cu	-0,35 ^d \pm 0,68
50 µM Pb	0,83 ^{ab} \pm 0,22
100 µM Pb	0,41 ^{bc} \pm 0,16

5.2.3. Pigmentos fotossintéticos e flavonóides.

Amostras de *G. floridanum* tratadas com cádmio, cobre e chumbo mostraram modificações no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (Tabela 3). A concentração de clorofila *a* mostrou uma maior redução após a exposição à 100 μM de Cu (43% comparado às amostras controle), seguido de 35% para o tratamento de 100 μM de Cd. A concentração das ficobiliproteínas (AFC, FC e FE) foi reduzida significativamente nas amostras *G. floridanum* expostas a ambas concentrações de Cd, Cu e Pb. Por outro lado, as amostras expostas à 50 e 100 μM de Pb mostraram um aumento no conteúdo de carotenóides, quando comparado com o controle e os outros tratamentos com metais. Quanto ao conteúdo de flavonóides houve um decréscimo significativo somente nas amostras tratadas com Cu, quando comparadas com as amostras controle e os demais tratamentos.

Tabela 4 – Pigmentos fotossintéticos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ Peso Fresco; Cl *a*, clorofila *a*; AFC, alofococianina; FC, ficocianina; FE, ficoeritrina; Car, carotenóides) e Flavonóides (Flav) de *G. floridanum* cultivados com 50 μM e 100 μM de Cd, Cu e Pb após o período de 7 dias. Dados são médias \pm Desvio Padrão ($n = 4$). As letras indicam as diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Tabela extraída de Santos *et al.* (2014).

Tratamentos	Cl <i>a</i>	AFC	FC	FE	Car	Flav
Controle	199 \pm 1,38 ^a	325 \pm 0,25 ^a	140 \pm 0,35 ^a	455 \pm 0,25 ^a	1,01 \pm 0,01 ^d	0,57 \pm 0,01 ^{ab}
50 μM Cd	196 \pm 0,54 ^b	180 \pm 0,45 ^d	80 \pm 0,20 ^d	300 \pm 0,25 ^d	0,96 \pm 0,02 ^c	0,48 \pm 0,06 ^b
100 μM Cd	128 \pm 1,20 ^c	180 \pm 0,18 ^d	75 \pm 0,20 ^e	260 \pm 0,20 ^e	1,07 \pm 0,00 ^e	0,69 \pm 0,03 ^a
50 μM Cu	196 \pm 1,13 ^b	175 \pm 0,85 ^e	70 \pm 0,25 ^f	185 \pm 0,25 ^f	0,47 \pm 0,02 ^f	0,19 \pm 0,02 ^d
100 μM Cu	112 \pm 0,75 ^d	115 \pm 0,25 ^f	45 \pm 0,55 ^g	130 \pm 0,35 ^g	0,53 \pm 0,02 ^g	0,31 \pm 0,06 ^c
50 μM Pb	197 \pm 0,29 ^{ab}	295 \pm 0,35 ^b	135 \pm 0,65 ^b	435 \pm 1,10 ^b	1,24 \pm 0,01 ^b	0,55 \pm 0,07 ^b
100 μM Pb	197 \pm 0,20 ^{ab}	195 \pm 0,25 ^c	85 \pm 0,25 ^c	300 \pm 0,50 ^c	1,29 \pm 0,01 ^a	0,67 \pm 0,03 ^{ab}

5.2.4. Microscopia confocal.

Quando observado em microscópio confocal, as células das amostras controle de *G. floridanum* mostraram uma grande quantidade de cloroplastos com coloração vermelha (Fig. 2A) e uma alta intensidade de autofluorescência (Fig. 2B). Por outro lado, as amostras expostas a 50 and 100 μM de Cd mostraram alterações na morfologia dos cloroplastos, com cor verde (Figs. 2C e E) e redução da intensidade de autofluorescência (Figs. 2D e F). Nos tratamentos com 50 e 100 μM de Cu, mudanças similares ocorreram na morfologia dos cloroplastos além da coloração verde (Figs. 2G e I), outra alteração observada foi a redução da autofluorescência dos cloroplastos (Figs. 2H e J). Os cloroplastos das plantas tratadas com 50 e 100 μM de Pb apresentaram a maior coloração vermelha (Figs. 2K e M) e a maior intensidade de autofluorescência (Figs. 2L e N) que as amostras tratadas com Cd e Cu, porém menor que o observado nas amostras controle.

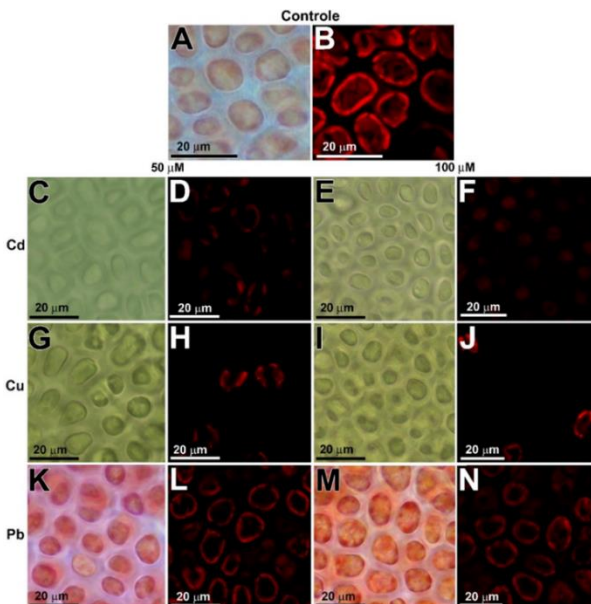


Figura 2 – Imagens de microscopia confocal de *G. floridanum*. A e B: Amostras controle. A: Observe a grande quantidade de cloroplastos (cor vermelha). B: Note a intensa autofluorescência dos cloroplastos. C e D: amostras tratadas com 50 μM de Cd. C: observe a cor verde dos cloroplastos. D: Note a redução da autofluorescência dos cloroplastos. E e F: amostras tratadas com 100 μM de Cd. E: observe a cor verde dos cloroplastos. F: Note a redução da autofluorescência dos cloroplastos. G e H: amostras tratadas com 50 μM de Cu. G: amostra com cor verde. H: observe que poucas células apresentam autofluorescência nos cloroplastos. I e J: amostras tratadas com 100 μM de Cu. I: amostra com cor verde. J: Observe a redução da autofluorescência dos cloroplastos. K e L: amostras tratadas com 50 μM Pb. K: amostras que mostra maior intensidade de cor avermelhada ao ser comparada com o controle. L: Observe autofluorescência dos cloroplastos. M e N: amostras tratadas com 100 μM de Pb. L: observe o aumento na intensidade da cor vermelha. N: amostras com maior intensidade de autofluorescência dos cloroplastos. Figura extraída de Santos *et al.* (2014).

5.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Quando observado pelo MET, as amostras controle de *G. floridanum* mostraram células corticais com poucos vacúolos, repletas de cloroplastos e com uma grande quantidade de grãos de amido das florídeas próximo aos cloroplastos (Fig. 3A). Estas células são envolvidas por uma espessa parede celular (Fig. 3B). Os cloroplastos apresentaram a organização interna típica das algas vermelhas com tilacóides paralelos (Fig. 3C). Nestes cloroplastos poucos plastoglóbulos foram observados entre os tilacóides (Fig. 3C). Pequenas mitocôndrias, ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso (RER) que se encontravam próximos aos cloroplastos e ao núcleo (Fig. 3D).

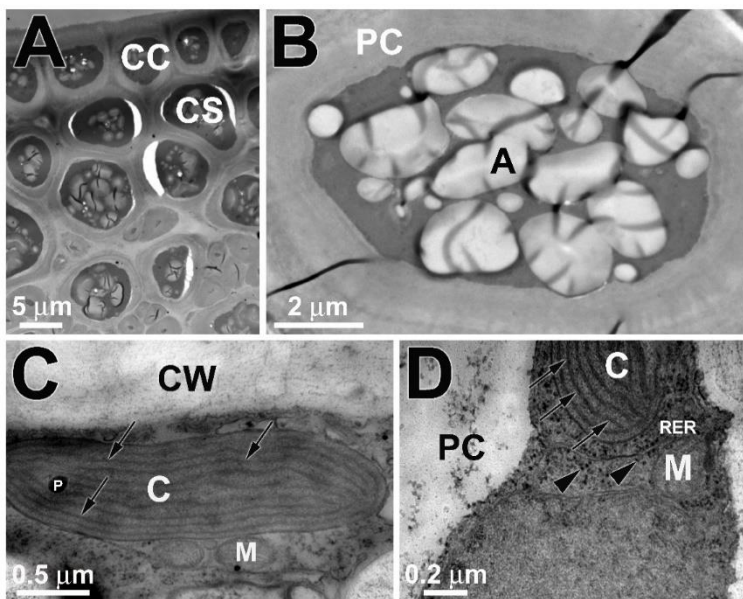


Figura 3 – Amostras controle de *G. floridanum* observadas no MET. A: Visão geral das células corticais (CC) e subcorticais (CS) mostrando vários grãos de amido das florídeas e cloroplastos envolvidos por uma espessa parede celular. B: detalhe da célula cortical mostrando os grãos de amido das florídeas (A) e a espessa parede celular (PC). C: detalhe do cloroplasto (C), mostrando os tilacóides (setas) e plastoglóbulos (p). Observe as mitocôndrias próxima a cloroplastos (M). D: Algumas organelas como ribossomos livres (cabeça de seta) e retículo endoplasmático (RER) em torno dos cloroplastos. Figura extraída de Santos *et al.* (2014).

Após os tratamentos com concentrações de 50 e 100 μM de Cd por 7 dias, as células corticais de *G. floridanum* apresentaram-se mais vacuolizadas (Fig. 4A) com aumento da espessura da parede celular, mostrando camadas concêntricas de microfibras (Fig. 4B). A presença de vesículas eletrondensas, formadoras de novas camadas de parede celular, também, foi observada nestas células (Fig. 4C). Os cloroplastos apresentaram poucas mudanças na organização ultraestrutural (Figs. 4C-E). Entretanto, alguns tilacóides apresentaram irregularidades na morfologia (Figs. 4F-G). Nos cloroplastos, ainda, houve aumento na quantidade de plastoglôbulos (Figs. 4D-E). Os grãos de amido das florídeas não foram observados nestas células. Algumas mitocôndrias estavam apresentaram dilatações (Fig. 4G).

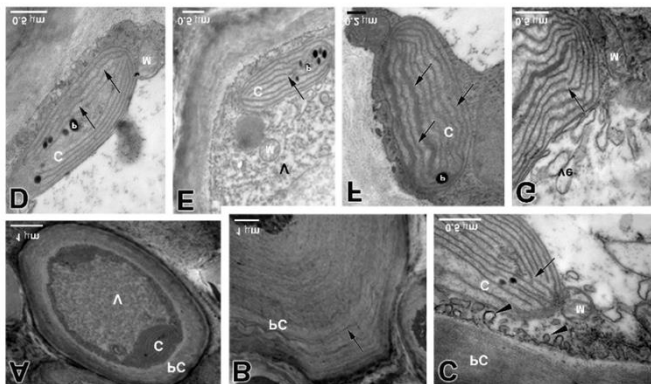


Figura 4 - Micrografias de MET das amostras de *G. floridanum* tratadas com Cd. A: detalhe da célula cortical tratada com 50 μM de Cd mostrando um grande vacúolo (V). Observe o cloroplasto (C) e a parede celular (PC). B: Detalhe da célula cortical tratada com 100 μM de Cd. Observe um aumento na espessura da parede celular com deposição de camadas concêntricas de microfibrilas (seta). C-D-E: detalhe da célula cortical tratada com 50 μM de Cd. C: Detalhe célula cortical mostrando vesículas contendo material de matriz de parede celular (cabeça de seta) e aumento na espessura da parede celular. Observe a ruptura nos tilacóides (setas) Mitocôndria (M). D: observe a irregularidade nos tilacóides (seta) e o aumento na quantidade de plastoglôbulos (P). E: Cloroplastos com aumento na quantidade de plastoglôbulos (P) e vacúolos (V). Note a ruptura nos tilacóides (setas). Observe a mitocôndria. F-G: células corticais tratadas com 100 μM de Cd. F: detalhe do cloroplasto mostrando irregularidades nos tilacóides (setas) e plastoglôbulo interno. G: magnificação do cloroplasto; observe a ruptura dos tilacóides (seta). Note as vesículas contendo matriz de parede celular (Ve). Figura extraída de Santos *et al.* (2014).

Tratamentos com cobre promoveram as maiores mudanças na ultraestrutura de *G. floridanum* do que os tratamentos com cádmio, as células corticais mostram uma grande redução no volume citoplasmático (Figs. 5A-B). As paredes celulares apresentaram aumento na espessura, com deposição de microfibras em camadas concêntricas (Figs. 5C-D). Nestas paredes depósitos elétrondensos, provavelmente depósitos de Cu foram observados (Fig. 5E). Alguns pequenos grãos de amido das florídeas foram observados no citoplasma (Figs. 5F-G). Os cloroplastos mostraram-se degradados e com tilacóides rompidos (Fig. 5H), a presença de plastoglóbulos também foi observada (Fig. 5H). As mitocôndrias estavam rompidas e infladas (Fig. 5I). Em algumas células, um grande vacúolo com conteúdo translúcido foi observado (Figs. 5J-K), juntamente com numerosos precipitados elétrondensos, provavelmente acúmulo de Cu (Figs. 5J-K).

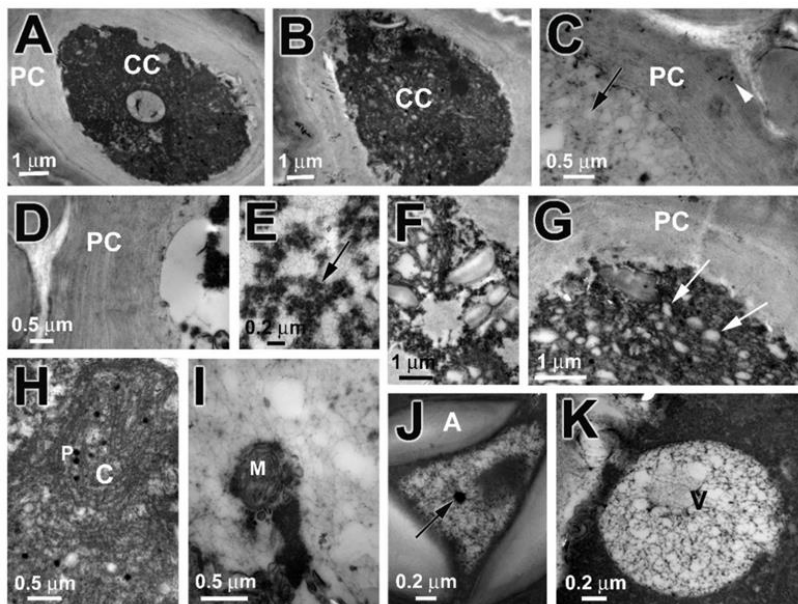


Figura 5 - Micrografias de MET das amostras de *G. floridanum* tratadas com Cu. A: detalhe da célula cortical (CC) tratada com 50 µM de Cu mostrando parede celular espessa (PC). B: detalhe da célula cortical tratada com 100 µM de Cu mostrando numerosos grãos de amido e parede celular espessa C: detalhe do aumento de espessura da parede celular da célula cortical tratada com 50 µM de Cu. Observe as vesículas de deposição na parede celular (seta) e deposição de metais (cabeça de seta). D: detalhe da parede celular da célula cortical tratada com 100 µM de Cu. E-F: células corticais tratadas com 50 µM de Cu. E: detalhe dos vacúolos com depósitos de metais (seta). F: detalhe de numerosos, pequenos grãos de amido. G-H: células corticais tratadas com 100 µM de Cu. G: detalhe das células corticais mostrando numerosos pequenos grãos de amido (seta). Note a espessura da parede celular. H: Observe as rupturas no cloroplasto (C) com a presença de plastoglóbulos (P). I: detalhe do vacúolo da célula cortical tratada com 50 µM de Cu. Note a alteração da mitocôndria (M). J-K: detalhe da célula cortical tratada com 100 µM de Cu. J: observe o vacúolo com depósito de metais (setas) e grãos de amido (A). K: detalhe do vacúolo (V) com conteúdo reticulado. Figura extraída de Santos *et al.* (2014).

Após o tratamento com Pb, as células corticais de *G. floridanum* mostraram poucas mudanças na morfologia, porém aumentaram a espessura da parede celular (Figs. 6A-C). Nas células corticais, aumento do volume vacuolar (Fig. 6B) pôde ser observado, junto com numerosos precipitados elétrondensos, provavelmente Pb (Figs. 6A-C). Também foi

observado grandes vesículas eletrondensas no citoplasma, sugerindo serem depósitos de Pb, (Figs. 6D-E). Além disso, os cloroplastos mostraram mudanças na organização ultraestrutural (Figs. 6D-E).

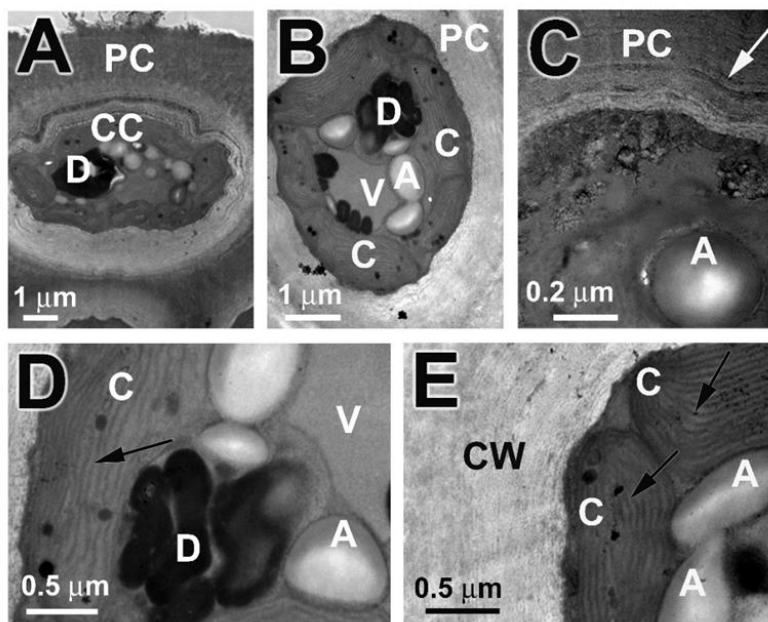


Figura 6 - Micrografias de MET das amostras de *G. floridanum* tratadas com Pb. A: célula cortical (CC) tratada com 50 µM de Pb mostrando numerosos grãos de amido e cloroplastos envolvidos por uma espessa parede celular (PC). A deposição de metais é visível (D). B: células corticais tratadas com 100 µM de Pb mostrando grãos de amido (A), vacúolo (V), depósito de metais e cloroplasto (C) envolvidas por espessa parede celular. C–D: detalhe da célula cortical tratada com 50 µM de Pb. C: magnificação da célula cortical. Observe o vacúolo com conteúdo granular. Observe um aumento na espessura da parede celular com deposição de microfibrilas concêntricas (seta). D: observe o aumento no montante dos grãos de amido, deposição de metais e organização dos tilacóides (seta). E: detalhe da célula cortical tratada com 100 µM de Pb. Observe os cloroplastos com aumento no montante de plastoglóbulo, tilacóides (seta), depósitos de metais e grãos de amido. Figura extraída de Santos *et al.* (2014).

5.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As imagens capturadas com o MEV mostraram a superfície rugosa na superfície da amostra controle (Fig. 7A). Já os tratamentos com Cd, Cu e Pb mostraram resultados diferentes, com diminuição da rugosidade da superfície na alga tratada com 50 μM de Cd (Fig. 7B), entretanto o tratamento com 100 μM de Cd (Fig. 7C) promoveu um aumento na rugosidade da superfície em relação à amostra controle. Ambos tratamentos de Cu (Fig. 7D-E) mostraram decréscimo na rugosidade da superfície comparado às amostras controle. Quando tratado com Pb (Fig. 7F-G), a rugosidade da superfície decresceu gradualmente de acordo com o acréscimo da concentração de Pb.

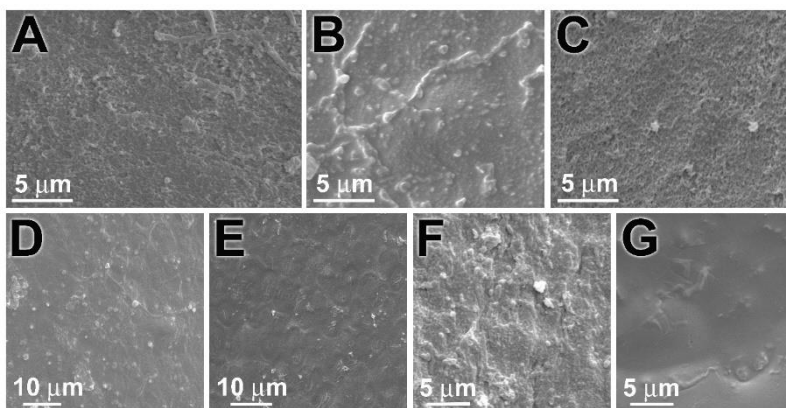


Figura 7 - Superfície do talo de *G. floridanum* observados no MEV. A: detalhe da rugosidade da superfície da parede celular das células corticais das amostras controle. B: Amostras tratadas com 50 μM de Cd mostraram um decréscimo na rugosidade da superfície. C: Amostras tratadas com 100 μM de Cd mostrando decréscimo na rugosidade da superfície. D: Amostras tratadas com 50 μM de Cu mostra um alisamento da superfície. E: amostras tratadas com 100 μM de Cu mostram um aumento no alisamento da superfície. F: amostras tratadas com 50 μM de Pb mostrando a rugosidade da superfície. G: Amostras tratadas com 100 μM de Pb mostrando um aumento no alisamento da superfície. Figura extraída de Santos *et al.* (2014).

Os resultados das microanálises de Raios-X de *G. floridanum* foram qualitativas (Tabela 4). As microanálises de Raios-X nas paredes celulares das amostras controle revelaram a presença de diferentes porcentagens de elementos como carbono, nitrogênio, oxigênio, sódio e potássio em todas as amostras. Cd, Cu e Pb não foram detectadas na

superfície das células controle porém, foi detectada a presença destes metais nos seus respectivos tratamentos (Tabela 4).

Tabela 5 – Análises com MEV mostrando a porcentagem de átomos na superfície de amostras de *G. floridanum* cultivados sem metais pesados e com 50 μM e 100 μM de Cd, Cu e Pb durante um período de 7 dias. Dados são médias \pm SD ($n = 3$). Letras indicam diferenças significante de acordo com teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Tabela extraída de Santos *et al.* (2014).

Tratamentos	C	N	O	Na	K	Cd	Cu	Pb
Controle	34,24 ^a \pm 3,12	32,12 ^a \pm 5,68	26,94 ^b \pm 1,67	2,77 ^d \pm 0,21	3,93 ^b \pm 0,16	-	-	-
50 μM Cd	34,27 ^a \pm 3,31	27,54 ^b \pm 2,30	30,74 ^a \pm 0,45	2,30 ^f \pm 0,38	2,20 ^b \pm 0,36	2,95 ^a \pm 0,35	-	-
100 μM Cd	30,94 ^b \pm 2,60	31,48 ^a \pm 5,21	29,98 ^a \pm 1,72	2,28 ^c \pm 0,23	2,51 ^b \pm 0,17	2,81 ^a \pm 0,17	-	-
50 μM Cu	26,95 ^c \pm 1,41	23,81 ^c \pm 5,05	24,65 ^{bc} \pm 1,71	5,04 ^a \pm 0,10	13,32 ^a \pm 0,43	-	6,23 ^a \pm 0,24	-
100 μM Cu	29,45 ^b \pm 3,21	25,74 ^{bc} \pm 6,10	25,45 ^{bc} \pm 2,13	2,21 ^c \pm 0,23	3,15 ^b \pm 0,65	-	9,10 ^a \pm 0,48	-
50 μM Pb	27,63 ^{bc} \pm 2,28	25,92 ^{bc} \pm 3,05	24,52 ^c \pm 2,15	3,93 ^b \pm 0,35	14,53 ^a \pm 0,36	-	-	2,47 ^a \pm 0,12
100 μM Pb	26,56 ^c \pm 2,10	34,16 ^a \pm 5,52	31,15 ^a \pm 2,86	1,25 ^e \pm 0,26	4,42 ^b \pm 0,20	-	-	2,56 ^a \pm 0,18

5.3. Discussão.

Os metais pesados afetam a biologia e o desenvolvimento de diversos organismos aquáticos, incluindo macroalgas, em múltiplas vias. Cádmio, cobre e chumbo estão entre os metais pesados mais tóxicos que poluem os ambientes aquáticos costeiros. O presente estudo mostrou que concentrações iguais de Cd, Cu e Pb induzem diferentes níveis de respostas fisiológicas, químicas e de organização celular na alga vermelha *G. floridanum*, indicando que diferentes mecanismos promovem a captura destes metais.

Os ensaios de bioabsorção mostraram uma grande acumulação de Cu em relação ao Cd e ao Pb, enquanto Cd mostrou a menor bioacumulação. As porcentagens da absorção de todas as amostras tratadas com 50 μM e 100 μM de Cd, Cu e Pb estão correlacionadas com o fator de bioabsorção de cada tratamento, respectivamente. As análises de raios-X com o EDS do MEV realizado nas amostras de *G. floridanum* detectaram a presença de Cd, Cu e Pb em todos os tratamentos, com a maior porcentagem para a presença de Cu na superfície. Entretanto, somente as amostras tratadas com 100 μM de Cu mostraram uma acumulação significativamente maior que as amostras tratadas com 50 μM Cu, e estes resultados diferem dos resultados de acumulação para Cd e

Pb, que não mostraram diferenças na acumulação entre as duas concentrações utilizadas. Estes dados sugerem que a interação entre Cu e a composição de polissacarídeos do ágar da matriz da parede celular é maior que a interação entre o ágar e os metais Cd e Pb. Esta evidência sugere, por sua vez, que o sequestro de Cu resulta na formação de complexos entre Cu e os grupos negativos do ágar. Belenikina (2008) também observou que agarófitas são bioacumuladores de metais pesados por causa da presença do ágar.

Após o período experimental, as amostras controle de *G. floridanum* apresentaram um aumento significativo na biomassa, entretanto as amostras tratadas com Cd, Cu e Pb mostraram um aumento menor na biomassa quando comparadas as amostras controle. Entre os tratamentos com metais a taxa de crescimento negativo foi fortemente detectada para o tratamento de 100 μM de Cu. Nos tratamentos de Pb, o aumento da biomassa também foi menor que nas amostras controle. Para explicar esses resultados, pode-se supor que as rotas metabólicas foram, provavelmente, desviadas para proteger o aparato fotossintetizante, também, nas células tratadas com metais houve aumento na espessura das paredes celulares, sugerindo uma estratégia físico-química para quelar e prevenir a entrada de metais nas células. Entretanto, o desvio de rotas metabólicas deve ter alterado a reprodução celular onde ocorreu uma redução nas taxas de crescimento das amostras de *G. floridanum* tratadas com metais.

Após o período experimental, as amostras controle de *G. floridanum* apresentaram ramificações, e sua cor avermelhada inicial permaneceu intacta. Porém, amostras tratadas com Cd mostraram diminuição na cor avermelhada e na ramificação quando comparada com o controle. Estas respostas foram menos intensas com a menor concentração de Cd. Entre todos os tratamentos, os talos tratados com Cu apresentaram a maior despigmentação e a alterações morfológicas. Ao contrário de Cu e Cd, os tratamentos com 50 μM de Pb não mostraram diferenças quando comparados ao controle, porém no tratamento com 100 μM , ocorreu branqueamento nos ápices dos talos. Entretanto, as taxas de crescimento destes tratamentos foram maiores para cada concentração quando comparadas com os tratamentos de Cu e Cd, respectivamente.

A queda na coloração vermelha observada nas amostras tratadas com Cd e Cu, bem como no tratamento com 100 μM de Pb, é corroborado com o decréscimo dos pigmentos acessórios, as ficobiliproteínas (AFC, FC e FE) em *G. floridanum*. Estes pigmentos são responsáveis pela coloração vermelha do talo. Eles estão localizados em estruturas

chamadas ficobilissomos e estão associados com a superfície dos tilacóides e são responsáveis pela captura de energia luminosa em comprimentos de onda complementar ao da clorofila *a* e transferem para o PSII (Xia *et al.* 2004). As ficobiliproteínas foram degradadas mostrando redução da quantidade, provavelmente como um mecanismo para prevenir o excesso de excitação energética que causa sérios danos oxidativo a vários compostos biológicos como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. É provável que a perda de pigmentos acessórios nas amostras de *G. floridanum* tratadas com metais causou a redução na fluorescência uma vez que os pigmentos acessórios transferem a energia luminosa para o PSII. Vários estudos mostraram que Cd causa modificações nos pigmentos acessórios, incluindo o trabalho de Xia *et al.* (2004), que tratou *Gracilaria lemaneiformis* (Bory de Saint-Vincent) Greville, com cádmio por 4 dias, Bouzon *et al.* (2012b) que cultivou *H. musciformis* com Cd por 7 dias, e Santos *et al.* (2012) que cultivou *G. domingensis* com Cd por 7 dias.

A quantificação de clorofila *a* mostrou, também, decréscimo na concentração para os tratamentos com 100 μ M de Cd e Cu, enquanto tratamentos com Pb não mostraram alterações significativas. Os tratamentos com Cd e Cu provavelmente promoveram uma redução na atividade enzimática (Stobart *et al.* 1985; Xia *et al.* 2004) ou promoveram a deficiência de Mg e Fe na biossíntese de clorofila *a* (Greger e Ogren 1991; Xia *et al.* 2004).

As análises das amostras de *G. floridanum* com a microscopia confocal mostraram a coloração avermelhada na superfície das células das amostras controle, porém nos tratamentos de Cd e Cu as células apresentaram coloração menos avermelhada. Os tratamentos com Pb mostraram o mesmo padrão de coloração que as amostras controle. As imagens da autofluorescência dos cloroplastos de *G. floridanum* tratados com Cd e Cu apresentaram maior redução na intensidade de autofluorescência, enquanto as amostras tratadas com Pb apresentaram uma redução menor na autofluorescência do cloroplasto quando comparado com as amostras controle Estes dados evidenciaram um maior dano no aparato fotossintetizante na presença de Cd e Cu.

A quantidade de carotenóides em *G. floridanum* não foi alterado nos tratamentos com Cd. Entretanto, foi alterada nos tratamentos com Cu e Pb. Nos tratamentos com Cu houve um decréscimo de 50% na quantidade de carotenóides. Porém, nos tratamentos com Pb houve aumento de carotenóides, sugerindo que os carotenóides podem agir como um mecanismo antioxidante na presença deste metal. Os

carotenóides são sintetizados e estocados nos cloroplastos como antioxidantes lipofílicos (Römer *et al.* 2002), e o aumento deste pigmento pode ser interpretado como um mecanismo de aclimação de proteção para prevenir efeitos tóxicos decorrentes da presença Pb. Gouveia *et al.* (2013) observaram estes resultados para *G. domingensis* tratada com Pb. Cólleen *et al.* (2003) e Pinto *et al.* (2003) obtiveram os mesmos resultados para *Gracilaria tenuistipitata* C.F.Chang & B.M. Xia tratada com Cd e Cu. De acordo com Gouveia *et al.* (2013), a produção de carotenóides é uma estratégia para evitar os efeitos das espécies reativas de oxigênio.

A quantidade de flavonóides diminuiu nos tratamentos de Cu, mas não se alterou de forma significativa nos tratamentos de 50 μM de Pb e 50 μM Cd. Porém, houve um aumento na quantidade de flavonóides em tratamentos de 100 μM de Pb e 100 μM de Cd. De acordo com Cólleen *et al.* (2003), os flavonóides são sintetizados com o propósito de impedir o estresse oxidativo. Em *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* E. C. Oliveira & Coll, Bouzon *et al.* (2012a) observaram que a quantidade de flavonóides em amostras coletadas do ambiente foi maior do que as do controle ou de amostras tratadas por UVB. É possível que a ação de flavonóides como um antioxidante em *G. floridanum* não seja um mecanismo eficaz na defesa contra os efeitos tóxicos de metais, uma vez que estes compostos não foram sintetizados em quantidades maiores.

As análises realizadas com MET mostraram a presença de partículas elétrondensas na parede celular em todos os tratamentos, provavelmente indicando os depósitos de Cd, Pb e Cu, também foram observadas vesículas de deposição de substâncias da parede celular. De acordo com Talarico (2002), em *A. saviana*, Bouzon *et al.* (2012b), em *H. musciformis* e Santos *et al.* (2013), em *G. domingensis*, e também no presente estudo, estes depósitos elétrondensos, na parede celular constituem acúmulo de Cd como mecanismo de retenção deste metal. Outro mecanismo de defesa foi o espessamento das paredes celulares.

As imagens da superfície externa da parede celular das amostras analisadas em MEV mostraram rugosidade da superfície da amostra controle. A adição do tratamento Cd mostrou a perda de rugosidade e depressão, o que pode ser associado com a alteração na camada mais exterior da parede da célula observada na análise do MET. O tratamento com 100 μM de Pb apresentou a maior perda de rugosidade entre todos os tratamentos de metal.

O aumento da espessura da parede da célula é uma estratégia de quelação em que os compostos sulfatados, que estão presentes em paredes celulares de algas, quelam esses metais (Diannelidis e Delivopoulos

1997). Outros trabalhos realizados com algas vermelhas tratadas com Cd obtiveram a mesma conclusão, que o aumento da espessura da parede celular é uma estratégia para prevenir a entrada de metal na célula, uma vez que os compostos de sulfato retêm os metais quelados (Andrade *et al.* 2010; Bouzon *et al.* 2012b, 2013; Santos *et al.* 2013). Uma vez que a parede celular bioabsorve os metais pesados, a bioacumulação também ocorre no interior da célula. Favero *et al.* (1996) avaliaram a importância da *Ulva rigida* (C. Agardh) como bioindicador de metais pesados no meio ambiente, já que o acúmulo de metais pesados ocorre no interior das células dessa alga. Análise de MET mostraram aumento dos vacúolos decorrente da deposição de metais.

Os efeitos deletérios dos tratamentos de Cd, Cu e Pb em amostras de *G. floridanum* sugerem que a quelação de metais por paredes celulares é insuficiente. Por outro lado, estes metais podem ter sido transportados por canais iônicos protéicos presentes nas membranas plasmáticas. O fato do Cu ter sido mais absorvido pode estar relacionado com esses canais de proteínas localizados em todas as membranas celulares (Yruella *et al.* 2005). Mais especificamente, o cádmio pode ser transportado por IRT1, um transportador de ferro, pertencente à família ZIP, bem como ATNramp3, um transportador de metal multiespecífico vacuolar envolvidos na resposta das plantas à deficiência de ferro, ou ainda pode ser transportado por transportadores de cálcio (Benavides *et al.* 2005). De acordo com Yruela (2005), muitos transportadores de Cu foram já caracterizados em células de plantas, tais como os da membrana celular (COPT1), citosol (chaperonas de cobre) e cloroplastos (COPT3, PAA1, PAA2 e CpCCS), mitocôndria (COX17) e no Corpo de Golgi (RAN1, acompanhantes e COPT5). Yruela (2005), também, relata a existência de proteínas transportadoras Pb. Devido à presença de transportadores na membrana plasmática, os metais pesados podem entrar facilmente na célula, promovendo alterações nas organelas, assim como nas proteínas, tais como pigmentos acessórios. De acordo com Cólle *et al.* (2003), os metais pesados também promovem a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem induzir mudanças em vários componentes celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos.

As amostras das células controle, analisadas no MET, mostraram cloroplastos e tilacóides paralelos e livres, a organização típica de algas vermelhas, e alguns plastoglóbulos. Por outro lado, as amostras tratadas com os respectivos metais apresentaram alterações ultraestruturais. Os cloroplastos das amostras tratadas por Cd e Pb apresentaram pequenas alterações como o aumento de plastoglóbulos, entretanto, os cloroplastos

das amostras tratadas com Cu foram alterados mais drasticamente. Estas alterações podem estar diretamente relacionadas ao aumento na promoção de ERO por metais pesados, especialmente o Cu, que induzem peroxidação e desestabilização das membranas dos cloroplastos (Li *et al.* 2006). Em experimentos com Cd em algas vermelhas também foi observado alterações na organização estrutural dos cloroplastos (Bouzon *et al.* 2012b; Santos *et al.* 2013; Talarico 2002). Outra característica que chamou a atenção foi o grande aumento no número de plastoglóbulos nos tratamentos com Pb. Provavelmente as células utilizem este mecanismo para a desintoxicação de metais pesados. Os plastoglóbulos são interpretados como materiais lipídicos (Schmidt *et al.* 2012c), e o aumento na quantidade de plastoglóbulos também foi observada na espécie *Ceramium ciliatum* (J.Ellis) Ducluzeau exposta ao Cd (Diannelidis e Delivopoulos 1997).

5.4. Conclusão.

O presente estudo mostrou que os tratamentos com Cd, Cu e Pb são tóxicos para *G. floridanum*, porque induziram uma série de mudanças na bioabsorção, nas características morfológicas estruturais e ultraestruturais, na taxa de crescimento, nos pigmentos fotossintetizante, e nos flavonóides. Houve, também, sérios danos no mecanismo fotossintetizante, que foi evidenciado através da descoloração, da necrose, da redução da clorofila *a*, da autofluorescência, na ultraestrutura dos cloroplastos e na biossíntese de grãos de amido. O aumento na espessura da parede celular está relacionado com as propriedades quelantes do ágar presente na composição amorfa da parede celular que foi induzida pelo aumento da concentração de metais no meio acoplado com a vacuolização das células. Cádmio e Pb promoveram o aumento da síntese de carotenóides, provavelmente como uma defesa química contra ERO. A toxicidade do cobre foi mais dramática para *G. floridanum* que os outros metais, seguido da toxicidade de Cd, enquanto a exposição ao Pb resultou numa adaptação potencial à toxicidade do metal. Estes resultados indicam que a suscetibilidade de *G. floridanum* para diferentes metais e concentrações destes, podem ser utilizadas como dados de suporte para subsídio de programas de monitoramento de impactos ambientais.

6. CAPÍTULO II: O efeito de diferentes concentrações de cobre e chumbo na morfologia e fisiologia de *Hypnea musciformis* cultivada *in vitro*: uma análise comparativa.

The effect of different concentrations of copper and lead on the morphology and physiology of *Hypnea musciformis* cultivated *in vitro*: a comparative analysis

Rodrigo W. Santos · Éder C. Schmidt · Izabela C. Vieira ·
Giulia B. Costa · Ticiane Rover · Carmen Simioni · José Bonomi Baruffi ·
Carlos Henrique L. Soares · Zenilda L. Bouzon

Received: 1 August 2014 / Accepted: 17 December 2014
© Springer-Verlag Wien 2015

Abstract Copper and lead, as remnants of industrial activities and urban effluents, have heavily contaminated many aquatic environments. Therefore, this study aimed to determine their effects on the physiological, biochemical, and cell organization responses of *Hypnea musciformis* under laboratory conditions during a 7-day experimental period. To accomplish this, segments of *H. musciformis* were exposed to photosynthetic active radiation at $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Cu (0.05 and 0.1 mg kg^{-1}), and Pb (3.5 and 7 mg kg^{-1}). Various intracellular abnormalities resulted from exposure to Cu and Pb, including a decrease in phycobiliproteins. Moreover, carotenoid and flavonoid contents, as well as phenolic compounds, were decreased, an apparent reflection of chemical antioxidant defense against reactive oxygen species. Treatment with Cu

and Pb also caused an increase in the number of floridean starch grains, probably as a defense against nutrient deprivation. Compared to plants treated with lead, those treated with copper showed higher metabolic and ultrastructural alterations. These results suggest that *H. musciformis* more readily internalizes copper through transcellular absorption. Finally, as a result of ultrastructural damage and metabolic changes observed in plants exposed to different concentrations of Cu and Pb, a significant reduction in growth rates was observed. Nevertheless, the results indicated different susceptibility of *H. musciformis* to different concentrations of Cu and Pb.

Keywords Heavy metals · Ultrastructure · Growth rates · *H. musciformis* · Photosynthetic efficiency

Protoplasma: DOI 10.1007/s00709-014-0751-8

6.1. Introdução.

Sendo um micronutriente essencial para os vegetais, o cobre (Cu) é um elemento estrutural em proteínas regulatórias (Yruela 2005). Entretanto, quando presente em excesso no ambiente, pode afetar o crescimento e importantes processos celulares como o transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração celular. Os sistemas de transportes de membranas parecem ser um alvo para este metal, possuindo um papel central nos processos de toxicidades (Yruela 2005). Resíduos industriais, domésticos e agrícolas podem resultar em drenagem do Cu para o meio marinho, além disto, pesticidas com Cu e tintas “antifouling” (anti-incrustantes) promovem o aumento nas concentrações de Cu nos ambientes aquáticos (Callow e Callow 2002).

Em contrapartida, o chumbo (Pb) não é um micronutriente essencial para os vegetais (Yruela 2005), porém, está entre os poluentes mais comuns em efluentes urbanos e industriais (Sheng *et al.* 2004). Atividades antrópicas do século XX, como a combustão de gasolina contendo Pb, o uso de aerossóis com chumbo são exemplos de descarga deste metal no ambiente (Horta-Puga *et al.* 2014). Como um agente estressor em vegetais, o Pb promove mudanças nos complexos protéicos ligados as moléculas de clorofila (Janik *et al.* 2013) e reduz, também, a taxa de transporte de elétrons do fotossistema II nas algas vermelhas (Gouveia *et al.* 2013).

Vários estudos com metais pesados mostraram efeitos sobre as macroalgas tais como redução nas taxas de crescimento (Bouzon *et al.* 2012b; Gouveia *et al.* 2013; Mamboya *et al.* 1999; Santos *et al.* 2012) e mudanças no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (Bouzon *et al.* 2012b; Gouveia *et al.* 2013; Rocchetta *et al.* 2007; Santos *et al.* 2012). Outros estudos, por sua vez, mostram que metais pesados promovem efeitos negativos na eficiência fotossintética (Schmidt *et al.* 2012c; Mamboya *et al.* 1999). Rocchetta *et al.* (2007) verificaram o aumento na quantidade de proteínas e no conteúdo lipídico em *Euglena gracilis* Klebs. Alguns destes trabalhos com metais pesados relataram mudanças na ultraestrutura das algas vermelhas *Audouinella savina* (F.S. Collins) Woelkerling (Talarico 2002), *Ceramium ciliatum* (J. Ellis) Ducluzeau (Diannelidis e Delivopoulos 1997), *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Bouzon *et al.* 2012b), *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Santos *et al.* 2013) e *Gracilaria domingensis* (Gouveia *et al.* 2013).

Os poluentes, como metais pesados, promovem efeitos diretos e indiretos no ecossistema podendo provocar mudanças nas taxas de decomposição, ciclo de nutrientes e na dinâmica do oxigênio (Fleege *et al.* 2003). No ambiente, as algas vermelhas acumulam metais pesados e são biosorventes para Cu e Pb (Garcia-Rios *et al.* 2004; Vilar *et al.* 2008). Como resultado, as paredes celulares que acumularam metais pesados podem servir como bom biomarcador (Sheng *et al.* 2004). Por outro lado, os metais que entram na célula podem produzir alterações nas estruturas subcelulares (Bouzon *et al.* 2012a; Santos *et al.* 2012; Gouveia *et al.* 2013) e promover, também, estresse oxidativo (Liu e Pang 2010).

Hypnea é fonte de *Kappa* carragenana, um importante ficolóides utilizado em todo o mundo, desta forma este gênero apresenta importância econômica significativa (Bouzon *et al.* 2006). Entre muitas macroalgas encontradas nos sistemas costeiros, *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux é um potencial bioindicador, devido à sua distribuição mundial no Atlântico, Índico e Pacífico (Bouzon 2006; Schmidt *et al.* 2012b). *H. musciformis* é uma das espécies mais conhecidas dentro do gênero *Hypnea* e foi relatada sua ocorrência em muitas regiões litorâneas tropicais e subtropicais (Silva *et al.* 1996). No Brasil esta espécie é comum ao longo da costa brasileira (Berchez e Oliveira 1989). Por ser uma espécie com ampla distribuição geográfica, neste estudo, nós investigamos *in vitro* o efeito de Cu e Pb para avaliar (1) as taxas de crescimento das algas em relação à absorção de Cu e Pb, (2) os pigmentos fotossintéticos, os compostos fenólicos, proteínas totais e perfil metabólico, (3) performance fotossintética e (4) morfologia e ultraestrutura do talo sob estas condições de estresse.

6.2. Resultados.

6.2.1. Absorção de cobre e chumbo.

Após o período experimental, as análises da porcentagem de absorção e o fator de bioconcentração tanto de Cu como Pb, não indicaram a presença destes metais nas amostras controle de *H. musciformis* (Fig. 8A). Entretanto, amostras cultivadas com Cu e Pb mostraram diferenças significativas nas taxas de absorção (Fig. 8A) e nos valores de bioconcentração (Fig.8B). As amostras tratadas com Cu mostraram taxas de absorção de 32,49% e 20,90% para os tratamentos de 0,05 mg.Kg⁻¹ and 0,1 mg.Kg⁻¹ de Cu, respectivamente. Para as amostras tratadas com Pb, os valores de bioabsorção foram menores, apresentando

6,99% e 16,93% para os tratamentos de 3,5 mg.Kg⁻¹ e 7 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Entretanto, as amostras cultivadas com Cu mostraram os maiores fatores de bioconcentração, como 398,33 e 514,9, comparados com o controle e os tratamentos com Pb.

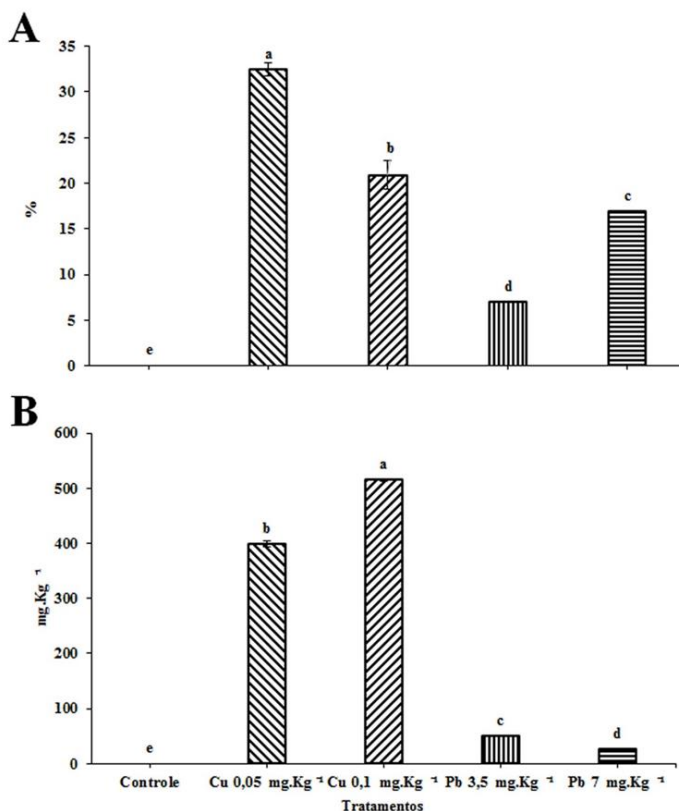


Figura 8: Valores de absorção e taxa de bioconcentração de *H. musciformis* após o período experimental. Barras verticais representam as médias (n=4) \pm Desvio Padrão dos valores. As letras indicam as diferenças significativas de acordo com o teste de Newman Keuls ($p \leq 0.05$). Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

6.2.2. Taxas de crescimento.

Após o período experimental, as amostras de *H. musciformis* mostraram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos valores das TC entre as amostras controle e os talos cultivados com diferentes concentrações de Cu e Pb (Fig. 9). As amostras controle obtiveram uma TC de $8,14 \text{ \%}.\text{dia}^{-1}$, enquanto os tratamentos de Cu de $0,05$ e $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$, mostraram uma significativa redução nas TC que, comparadas ao controle decresceram $44,85$ e $48,04\%$, respectivamente. Já as amostras de *H. musciformis* tratadas com Pb ($3,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e 7 mg.Kg^{-1}) mostraram uma redução nas TC de $21,98\%$ e $19,05\%$, respectivamente, comparadas ao controle.

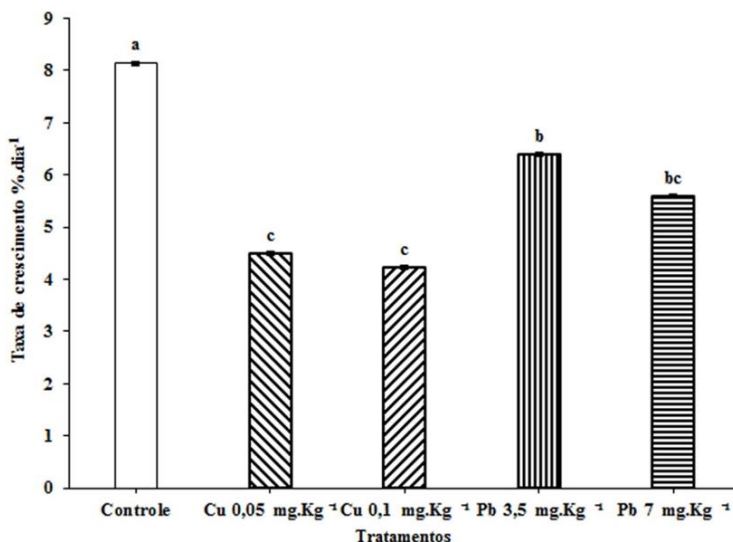


Figura 9: Taxas de Crescimento de *H. musciformis* após o período experimental. Barras verticais representam as médias ($n=4$) \pm Desvio Padrão dos valores. As letras indicam as diferenças significantes de acordo com o teste de Newman Keuls ($p \leq 0.05$). Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

As amostras controle de *H. musciformis* apresentaram as ramificações avermelhadas características da espécie (Fig. 10A). Porém, ficou evidente a despigmentação de alguns segmentos apicais em amostras tratadas com $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu (Fig. 10B), mas este efeito foi mais marcante nas amostras tratadas com $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu (Fig. 10C).

Os tratamentos utilizando $3,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e 7 mg.Kg^{-1} de Pb mostraram redução nas ramificações porém, a coloração do talo manteve-se similar ao o observado nas plantas controle (Fig. 10D e E).

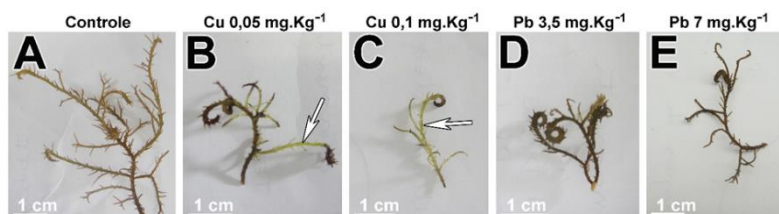


Figura 10: Morfologia das amostras de *H. musciformis* após 7 dias de tratamento. A: Controle; B e C tratamento com Cu, Amostras apresentam branqueamento do talo (seta); D e E tratamento com Pb, nenhum branqueamento é evidente. Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

6.2.3. Pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos totais, flavonóides e proteínas totais.

As amostras de *H. musciformis* controle, e os tratamentos com Cu e Pb apresentaram diferenças no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (Tabela 5). A concentração de clorofila *a* decresceu após a exposição ao Cu e ao Pb, enquanto as amostras tratadas com 7 mg.Kg^{-1} de Pb mostraram um aumento da clorofila *a* em 31.75% em relação ao observado nas plantas controle. As concentrações de ficobiliproteínas (AFC, FC, e FE) e dos compostos fenólicos em *H. musciformis* mostraram uma grande redução para ambas as concentrações de Cu, o que também foi observado para o tratamento com 7 mg.Kg^{-1} de Pb. Por outro lado, a concentração de flavonóides e carotenóides totais (Tabela 5) em plantas expostas ao Cu e ao Pb mostraram um decréscimo significativo comparados as plantas controle. A concentração de proteínas totais decresceu em 26,21% nas amostras de *H. musciformis* tratadas com $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu, enquanto amostras tratadas com 7 mg.Kg^{-1} de Pb resultaram em redução de 17,84% (Tabela 5).

Tabela 6: Alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos, fenólicos, flavonóides, carotenóides e proteínas totais nos tratamentos controle, com Cu e Pb, após 7 dias de cultivo. Os valores representam médias \pm DP ($n = 4$) em mg Kg⁻¹. As letras indicam as significâncias de acordo com o teste de Newman Keuls ($p \leq 0.05$). Tabela extraída de Santos *et al.* (2015).

	Controle	Cu 0,05 mg.Kg ⁻¹	Cu 0,1 mg.Kg ⁻¹	Pb 3,5 mg.Kg ⁻¹	Pb 7 mg.Kg ⁻¹
Clorofila <i>a</i>	192,67 \pm 6,94 ^b	163,71 \pm 3,95 ^d	179,75 \pm 5,24 ^c	183,54 \pm 8,72 ^c	261,41 \pm 11,00 ^a
Aloficocianina	109,41 \pm 4,42 ^a	63,17 \pm 3,16 ^c	60,11 \pm 4,11 ^c	80,42 \pm 3,82 ^b	61,01 \pm 0,08 ^c
Ficocianina	66,35 \pm 2,87 ^a	47,30 \pm 1,35 ^b	33,39 \pm 1,81 ^d	49,89 \pm 0,83 ^b	42,03 \pm 0,86 ^c
Ficoeritrina	146,83 \pm 6,37 ^a	93,63 \pm 2,10 ^c	82,00 \pm 2,89 ^e	112,43 \pm 3,96 ^b	86,45 \pm 1,19 ^d
Fenólicos	49,40 \pm 2,23 ^a	26,09 \pm 1,89 ^b	19,84 \pm 0,62 ^c	28,34 \pm 2,37 ^b	18,46 \pm 0,64 ^c
Flavonóides	51,68 \pm 2,05 ^a	16,66 \pm 0,82 ^d	15,88 \pm 0,21 ^d	36,28 \pm 1,07 ^b	30,56 \pm 0,47 ^c
Carotenóides	6,61 \pm 0,31 ^a	2,47 \pm 0,03 ^d	2,00 \pm 0,17 ^d	5,45 \pm 0,59 ^b	4,49 \pm 0,06 ^c
Proteínas totais	11,83 \pm 0,57 ^a	11,24 \pm 0,71 ^a	8,70 \pm 0,06 ^b	11,54 \pm 0,41 ^a	9,72 \pm 0,15 ^b

6.2.4. Parâmetros fotossintéticos.

As amostras de *H. musciformis* mostraram diferenças significativas nos parâmetros fotossintéticos, como o ETR_{real} (Fig. 11A), que decresceu nos tratamentos com Cu. O ETR_{max} (Fig. 11B) que demonstrou um decréscimo somente para o tratamento com 0.1 mg.Kg⁻¹ de Cu. Já F_v/F_m aumentou nos tratamentos com Cu, mas não ocorreu o mesmo com os tratamentos com Pb (Fig. 11C). Entre todos os tratamentos, E_k (Fig. 11D) e a ((Fig. 11E) não resultaram diferenças significativas. YII (Fig. 12A), YNO (Fig. 12B) e YNPQ (Fig. 12C) que foram analisadas utilizando o cálculo de Integral Definida (DI) do rendimento do fotossistema II (DIYII), e nenhuma diferença significativa foi vista entre os tratamentos. Entretanto, Cu promoveu um aumento em DIYNO e um decréscimo em DIYNPQ (Tabela 6). Enquanto isso os tratamentos com Pb não resultaram diferenças significantes em relação ao DIYNO, mas decresceram em DIYNPQ (Tabela 6).

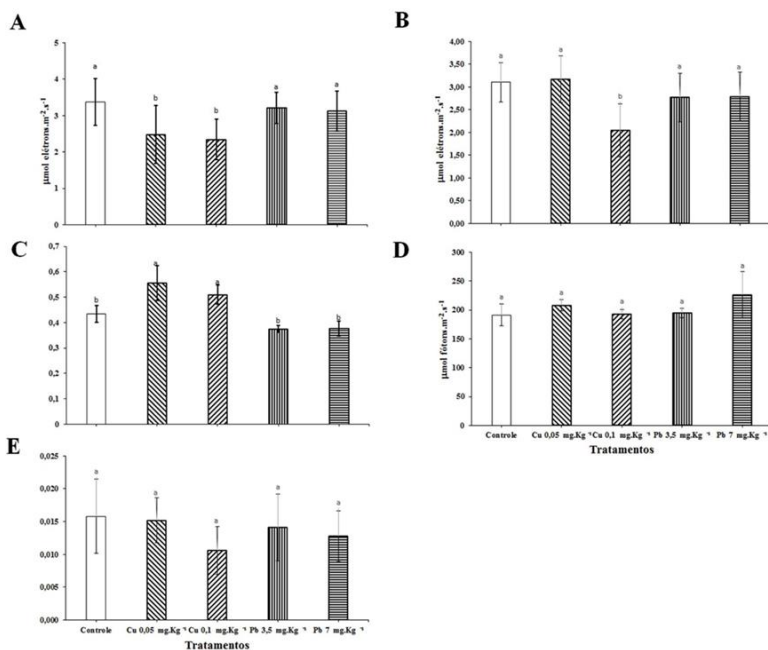


Figura 11: Parâmetros fotossintéticos das amostras de *H. musciformis* após os tratamentos com Cu e Pb. A: ETR_{real} ; B: ETR_{max} ; C: Fv/Fm; D: E_k ; E: α . Os valores representam as médias ($n=4$) \pm Desvio Padrão. As letras indicam as diferenças significantes de acordo com o teste de Newman Keuls ($p \leq 0.05$). Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

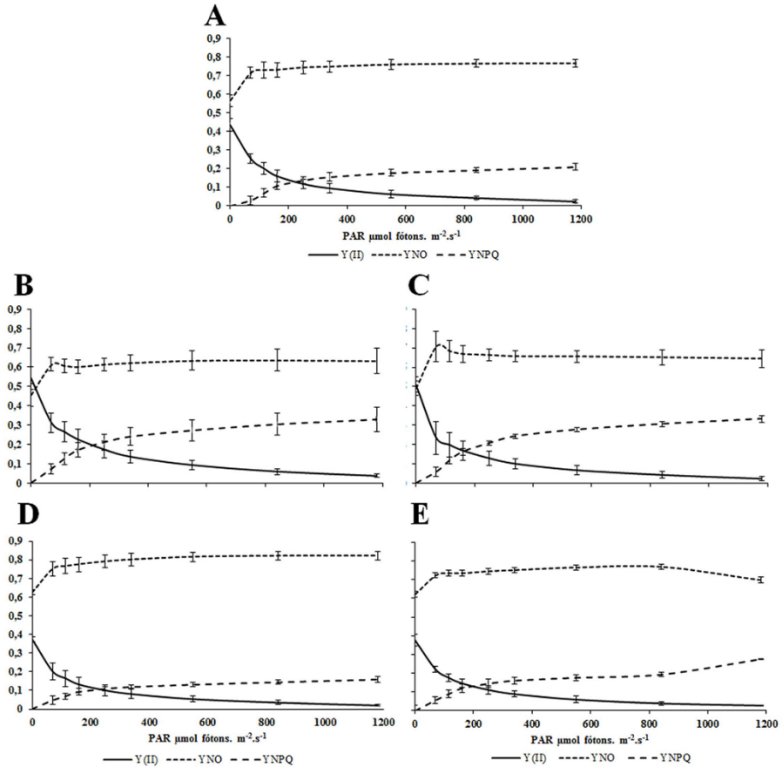


Figura 12: YII, YNO e YNPQ das amostras de *H. musciformis* após 7 dias de exposição ao Cu e ao Pb. A: Controle; B: 0,05 mg.Kg⁻¹ de Cu; C: 0,1 mg.Kg⁻¹ de Cu; D: 3,5 mg.Kg⁻¹ de Pb; E: 7 mg.Kg⁻¹ de Pb. Os valores representam as médias (n=4) ±Desvio Padrão. Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

Tabela 7: Mudanças em DIYII, DIYNO e DIYNPQ nos tratamentos controle, com Cu e Pb, após 7 dias de cultivo. Os valores representam médias ±Desvio Padrão (n = 4). As letras indicam as significâncias de acordo com o teste de Newman Keuls (p ≤ 0.05). Tabela extraída de Santos *et al.* (2015).

	Controle	Cu 0,05 mg.Kg ⁻¹	Cu 0,1 mg.Kg ⁻¹	Pb 3,5 mg.Kg ⁻¹	Pb 7 mg.Kg ⁻¹
DI Y(II)	115,62±15,46 ^a	156,8±18,58 ^a	126,49±12,10 ^a	100,75±6,79 ^a	104,6±9,72 ^a
DI YNO	892,21±26,92 ^a	761,62±8,48 ^b	789,20±22,52 ^b	928,25±1,65 ^a	869,0±15,18 ^a
DI YNPQ	179,60±19,18 ^c	282,32±10,26 ^a	315,80±28,55 ^a	150,46±8,08 ^d	238,6±24,03 ^b

A curva ETR (Fig. 13) mostrou que as amostras de *H. musciformis* tratadas com $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu apresentaram um decréscimo após 7 dias de experimento. Entretanto, os tratamentos de Pb não resultaram em mudanças na curva de ETR.

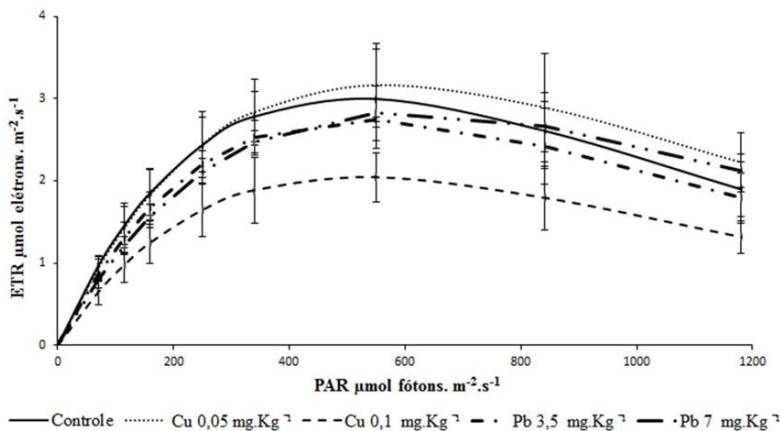


Figura 13: Taxa relativa de transporte de elétrons versus luz emitida e medida pelo PAM nas amostras de *H. musciformis* tratadas por 7 dias com 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} de Cu e 3,5 e 7 mg.Kg^{-1} de Pb. Os valores representam as médias ($n=4$) \pm Desvio Padrão. Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

6.2.5. Microscopia de luz – ácido periódico de Schiff (PAS).

As amostras controle de *H. musciformis* corado com PAS exibiram uma reação positiva (Fig. 14A) indicando a presença de polissacarídeos neutros como os grãos de amido das florídeas e sugerindo a presença de compostos celulósicos na parede celular. Usando esta mesma técnica citoquímica, não houve detecção de mudanças nas amostras tratadas com as menores concentrações de Cu (Fig. 14C) e Pb (Fig. 14E). Em contrapartida, as amostras tratadas com $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu e 7 mg.Kg^{-1} de Pb mostraram um aumento no número de grãos de amido, especialmente nas células corticais (Fig. 14B, D). As amostras tratadas com os diferentes metais e diferentes concentrações não mostraram diferenças na deposição de compostos celulósicos na parede celular (Figs. 14B-E).

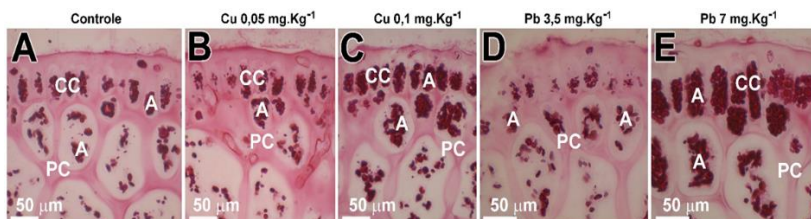


Figura 14: Microscopia de luz de cortes transversais de talos de *H. musciformis* após 7 dias de cultivo tratadas com PAS. Observe polissacarídeos neutros na parede celular (celulose) e no citoplasma (grãos de amido) PAS positivos; A: Controle; observe a parede celular (seta) e grãos de amido das florídeas (A). B: Amostra tratada com $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu, parede celular (seta), A (grãos de amido). C: Amostra tratada com $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu, parede celular (seta), A (grãos de amido). D: Amostra tratada com $3,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Pb, parede celular (seta), A (grão de amido). E: Amostra tratada com 7 mg.Kg^{-1} de Pb, parede celular (seta), A (grão de amido). Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

6.2.6. Observações ao microscópio eletrônico de transmissão.

As observações ao MET das amostras controle de *H. musciformis* possuem, nas células corticais circundadas por uma espessa parede celular com camadas concêntricas de microfibrilas e citoplasma com uma grande quantidade de grãos de amido das florídeas próximo aos cloroplastos (Fig. 15A). Nos cloroplastos, poucos plastoglóbulo são observados entre os tilacóides (Fig. 15B). Nestas células pequenas mitocôndrias estavam presentes em associação com os cloroplastos (Fig. 15C).

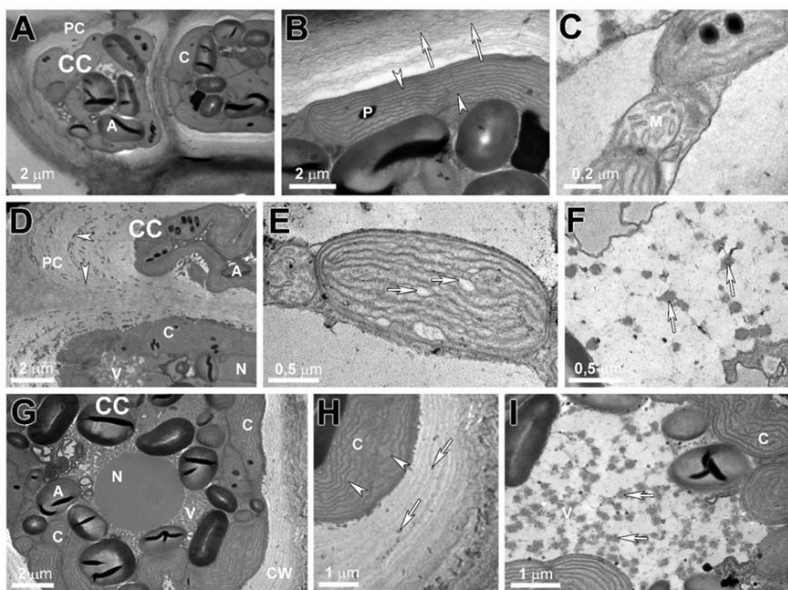


Figura 15: Micrografias de MET do controle e dos tratamentos com Cu de *H. musciformis* após o período experimental. A-C: Amostras controle. A: Célula cortical com parede celular espessa (PC), cloroplastos (C) e grãos de amido (A). B: Detalhe do cloroplasto (C), mostrando o plastoglóbulo (P). Microfibrilas de celulose (setas). C: Observe a mitocôndria com cristas tubulares próxima a cloroplastos (M). D-H: Células corticais tratadas com $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu. D: Células corticais mostrando parede celular com pontos elétrondensos (cabeça de seta) e vacuolização (V). E: Cloroplasto (C) apresentando espaçamento entre os tilacóides (cabeças de seta). F: O vacúolo com deposição de material elétrondenso (setas). G-I: Células corticais tratadas com $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu. G: Célula cortical; com pequeno vacúolo (V). H: Observe os depósitos de pontos elétrondensos na parede celular (seta); e irregularidade dos tilacóides (cabeças de seta). I: Vacúolo (V) com conteúdo elétrondenso. Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

Nas amostras tratadas com $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu, as células corticais apresentam-se vacuoladas (Fig. 15D), com presença de partículas elétrondensas na parede celular. Os cloroplastos mostraram poucas mudanças na organização ultraestrutural (Fig. 15E). Em particular, o vacúolo apresentou deposição de material elétrondensos (Fig. 15F). As células corticais das amostras de *H. musciformis* tratadas por 7 dias com $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu também apresentaram vacuolização (Fig. 15G). As células corticais exibiram deposição de pontos elétrondensos (Fig. 15H), e os cloroplastos também mostraram poucas mudanças na organização

ultraestrutural (Fig. 15H). O vacúolo apresentou deposição de material elétron denso (Fig. 15I). Entretanto, amostras tratadas com 3 mg.Kg^{-1} de Pb mostraram algumas mudanças perceptíveis na forma das células corticais (Fig. 16A). Alguns precipitados elétron densos foram observados na parede celular (Fig. 16B). Os cloroplastos mostraram poucas mudanças na organização ultraestrutural (Fig. 16C), e os grãos de amidos foram observados em torno dos cloroplastos (Fig. 16C). O vacúolo apresentou deposição de material elétron denso (Fig. 16D). As células corticais de *H. musciformis* tratadas com 7 mg.Kg^{-1} de Pb apresentaram numerosos precipitados elétron densos na parede celular (Fig. 16E and F). Os cloroplastos mostraram mudanças na organização ultraestrutural com dilatação dos tilacóides (Fig. 16G), e o vacúolo apresentou deposição de material elétron denso (Fig. 16H).

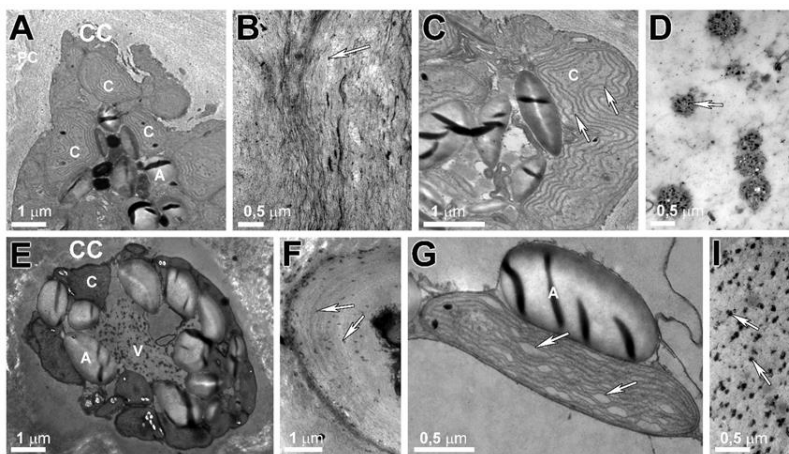


Figura 16: Micrografias de MET dos tratamentos com Pb de *H. musciformis* após o período experimental. A-D: Células corticais tratadas com $3,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Pb. A: Célula cortical. B: Detalhe da parede celular; depósito de grânulos elétron densos (setas). C: Detalhe do cloroplasto com alterações nos tilacóides (setas). D: Magnificação do vacúolo com depósitos grânulos elétron densos. E-I: células corticais tratadas com 7 mg.Kg^{-1} de Pb. E: Célula cortical. F: Detalhe da parede celular; depósitos de pontos elétron densos (seta). G: Detalhe do cloroplasto com alterações nos tilacóides (setas). H: Magnificação do vacúolo com depósitos de pontos elétron densos (setas). Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

6.2.7. Microscopia eletrônica de varredura.

Após o período experimental as observações ao MEV da superfície das amostras de *H. musciformis* tratamento controle, e tratamentos com Cu e Pb mostraram diferentes resultados (Figs. 17A-E). A superfície das amostras controle mostraram-se enrugadas (Fig. 17A). Entretanto, com o aumento da concentração de Cu na cultura a superfície tornou-se ondulada (Fig. 17B -C). Por outro lado, as amostras tratadas com 3,5 mg.Kg⁻¹ de Pb mostraram a formação de pequenas escamas na superfície (Fig. 17D), enquanto houve formação de grandes escamas na superfície das amostras tratadas com 7 mg.Kg⁻¹ de Pb (Fig. 17E).

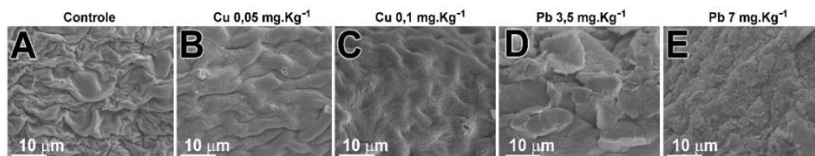


Figura 17: MEV da superfície de *H. musciformis* após o experimento. A: Detalhe da rugosidade da superfície da parede celular das células corticais controle. B: Amostras tratadas com 0,05 mg.Kg⁻¹ de Cu mostrando um decréscimo na rugosidade da superfície. C: Amostras tratadas com 0,1 mg.Kg⁻¹ de Cu mostrando um decréscimo na rugosidade da superfície. D: Amostras tratadas com 3,5 mg.Kg⁻¹ de Pb mostrando escamação na superfície. E: Amostras tratadas com 7 mg.Kg⁻¹ de Pb mostrando um aumento na escamação da superfície. Barras= 10 mm. Figura extraída de Santos *et al.* (2015).

Os resultados das análises de raios-X em *H. musciformis* foi qualitativa (Tabela 7). As microanálises de raios-X da superfície da parede celular das células controle revelaram a presença de diferentes elementos como carbono, nitrogênio, oxigênio, sódio, magnésio e cálcio, em todas as amostras. Cu e Pb não foram detectados na superfície da parede celular das amostras controle, mas a presença destes metais em seus respectivos tratamentos foi detectada (Tabela 7).

Tabela 8: Análises com EDS-MEV, porcentagem de átomos na superfície das amostras *H. musciformis* tratamentos controle e 0,05, 0,1 mg.Kg⁻¹ de Cu; 3,5 e 7 mg.Kg⁻¹ de Pb após período experimental. Os valores representam médias \pm DP (n = 4). As letras indicam as significâncias de acordo com o teste de Newman Keuls ($p \leq 0.05$). Tabela extraída de Santos *et al.* (2015).

Tratamentos	C	N	O	Na	Mg	Ca	Cu	Pb
Controle	45,32 \pm 2,48 ^a	18,26 \pm 2,14 ^b	25,09 \pm 1,23 ^d	4,36 \pm 1,67 ^a	4,06 \pm 0,33 ^d	2,90 \pm 1,13 ^c	-	-
0,05 mg.Kg ⁻¹ Cu	48,31 \pm 1,63 ^a	21,06 \pm 2,05 ^b	21,28 \pm 1,76 ^c	3,78 \pm 1,71 ^b	2,52 \pm 0,19 ^d	1,96 \pm 0,73 ^c	2,07 \pm 0,26 ^a	-
0,1 mg.Kg ⁻¹ Cu	20,46 \pm 2,51 ^c	22,65 \pm 3,35 ^a	36,12 \pm 1,32 ^c	0,96 \pm 2,13 ^{bc}	6,97 \pm 3,78 ^c	10,37 \pm 4,65 ^a	2,47 \pm 0,38 ^a	-
3,5 mg.Kg ⁻¹ Pb	26,88 \pm 1,43 ^b	17,12 \pm 3,05 ^c	39,64 \pm 0,63 ^b	0,72 \pm 0,63 ^c	8,22 \pm 3,03 ^b	3,96 \pm 3,96 ^b	-	3,45 \pm 1,21 ^a
7 mg.Kg ⁻¹ Pb	20,40 \pm 3,81 ^c	12,85 \pm 3,14 ^d	44,47 \pm 0,67 ^a	0,67 \pm 0,79 ^d	13,88 \pm 3,49 ^c	3,66 \pm 1,66 ^b	-	4,07 \pm 0,98 ^a

6.3. Discussão.

O presente estudo mostrou que Cu e Pb induzem diferentes níveis de respostas fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais na alga vermelha *H. musciformis*, indicando a ativação de diferentes mecanismos que promovem a absorção e a toxicidade destes elementos.

Os ensaios de bioabsorção de *H. musciformis* mostraram uma bioacumulação de 32,5% para o tratamento de 0,05 mg.Kg⁻¹ de Cu, mas somente 16,93% para o tratamento de 7 mg.Kg⁻¹ de Pb. A porcentagem de absorção representa a capacidade de *H. musciformis* em capturar íons Cu e Pb no ambiente. Ambos tratamentos com Cu mostraram os maiores valores de absorção, sendo que o tratamento de 0,1 mg.Kg⁻¹, mostrou menor absorção que o tratamento de 0,05 mg.Kg⁻¹. A ausência de aumento proporcional de bioabsorção com o aumento da concentração Cu sugere que o mecanismo de captação do metal ficou saturado. Por outro lado, tratamentos com Pb mostraram a menor porcentagem de absorção, mas esta porcentagem aumenta conforme aumenta a concentração de Pb. O fator de bioacumulação (FBC) representa a afinidade do poluente por um organismo. Nossos resultados mostram que os aumentos na concentração de Cu promovem o aumento no FBC. Entretanto, nos tratamentos com Pb o aumento na concentração promoveu decréscimo no FBC, possivelmente isso indica que a capacidade de *H. musciformis* para assimilar Cu é maior que a capacidade para assimilar Pb.

As análises de raios-X com EDS-MEV detectaram a presença de Cu e Pb em seus respectivos tratamentos, com uma maior presença de Pb na superfície das amostras. Este dado sugere que a interação entre Pb e a composição polissacarídica da carragenana da matriz de parede celular é maior que a interação com Cu. Isto deve ter sido por causa da grande absorção de Cu quando comparado ao Pb, como demonstrado pelo FBC. Ao MET, foi observado também a presença de algumas partículas elétrondensas na parede celular em todos tratamentos, provavelmente são depósitos de Cu e Pb. Talarico (2002) observou deposição similar de partículas elétrondensas na parede celular de *Audouliella saviana*, tratada com Cd e atribuiu este fato ao Cd. Este fenômeno também foi observado em *H. musciformis* tratada por 7 dias com Cd (Schmidt *et al.* 2012c), *G. domingensis* (Santos *et al.* 2013) e *P. capillacea* (Felix *et al.* 2014) tratadas por 7 dias com Cd. Esta precipitação de metais nas paredes celulares pode ter ocasionado as diferentes mudanças na rugosidade da superfície de *H. musciformis* analisadas ao MEV.

Após o experimento, em ambos tratamentos de Cu e Pb, as análises de MET mostraram aumento na vacuolização e deposição de metais na parede celular e vacúolos. O mesmo resultado foi verificado por Santos *et al.* (2013) em *G. domingensis* tratada com Cd, Santos *et al.* (2014) em *G. floridanum* tratados com Cd, Cu e Pb, e ainda, Bouzon *et al.* (2012a) em *H. musciformis* tratado com Cd. No presente estudo, tais danos indicam que a quelação dos metais pela parede celular de *H. musciformis* não foi o suficiente. Assim sendo, com a presença de transportadores na membrana plasmática, metais como Cu e Pb podem entrar facilmente na célula, promovendo alterações nas organelas bem como nas proteínas, e também como pigmentos. Nossas análises não mostram aumento na espessura da parede celular. O aumento na espessura da parede celular é uma estratégia de defesa em que compostos sulfatados da parede celular da alga podem quelar metais (Diannelidis e Delivopoulos 1997), prevenindo que aminoácidos metálicos quelados entrem na célula (Andrade *et al.* 2010; Santos *et al.* 2013). Outras pesquisas com algas vermelhas tratadas com Cd também mostraram aumento na espessura da parede celular (Bouzon *et al.* 2012b; Santos *et al.* 2013).

Após o período experimental, as amostras controle de *H. musciformis* apresentaram um significativo aumento na biomassa, ao passo que as amostras tratadas com Cu e Pb mostraram diminuição na biomassa. As taxas de crescimento foram menores nos tratamentos com Cu. Por conta destes resultados, pode-se supor que as vias metabólicas foram desviadas para proteger o aparato fotossintético, sugerindo uma estratégia físico-química para neutralizar os efeitos prejudiciais dos metais às células. Ao mesmo tempo, no entanto, esta estratégia de defesa alteram as taxas de crescimento das amostras de *H. musciformis* tratadas com Cu e Pb.

Por outro lado, Gouveia *et al.* (2013) demonstraram em *G. domingensis* cultivada por 7 dias com 5 e 10 μM de Cu, diferentes resultados, com TC negativos e redução na biomassa. O fato que Cu é um nutriente essencial na formação de metaloenzimas indicam a presença de proteínas transportadoras de Cu em todas as membranas celulares (Yruella *et al.* 2005).

A quantificação de clorofila *a* mostrou decréscimo para os tratamentos com Cu. Enquanto tratamentos com 3,5 mg.Kg^{-1} de Pb não houve efeitos significativos, por outro lado, o tratamento com 7 mg.Kg^{-1} de Pb mostrou aumento no conteúdo de clorofila *a*. Provavelmente, os tratamentos com Cu promoveram redução na atividade enzimática

(Stobart *et al.* 2006; Xia *et al.* 2004) ou promoveram deficiência de Mg e Fe na biossíntese de clorofila *a* (Greger e Ogren 1991; Xia *et al.* 2004).

As amostras de *H. musciformis* apresentaram alteração em alguns parâmetros de eficiência fotossintética. As amostras tratadas com Cu apresentaram aumento no rendimento quântico (F_v/F_m), enquanto os tratamentos com Pb não promoveram mudanças significativas. Cu e Pb não promoveram mudanças significativas no fotossistema II, baseado no rendimento quântico efetivo (YII). Cobre, no entanto, promoveu decréscimo na perda não regulada fotoquimicamente (YNO), enquanto Pb promoveu decréscimo na perda regulada fotoquimicamente (YNPQ). As taxas de transporte de elétrons (ETR) decresceram somente com o tratamento de 0,1 mg.Kg⁻¹ de Cu. Os resultados sugerem que a alga em estudo adotou estratégias diferentes a fim de manter a eficiência fotossintética durante o estresse. Assim, por exemplo, enquanto a clorofila *a* apresenta decréscimo, juntamente com um decréscimo maior das ficobiliproteínas, em amostras tratadas com Cu, e um aumento em F_v/F_m e Y(NPQ) também foi visto. Entretanto, Pb promoveu um incremento em Y(NO), bem como um aumento na clorofila *a* que podem ter compensado os danos promovidos por Pb. As ficobiliproteínas foram degradadas ao diminuir a sua quantidade, provavelmente como um mecanismo implementado para evitar o excesso de energia de excitação do fotossistema II que causa dano oxidativo grave também para outros compostos biológicos como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. Isto corrobora com nossos resultados mostrando que os tratamentos com 0,1 mg.Kg⁻¹ de Cu and 3,5 mg.Kg⁻¹ de Pb promovem um aumento no conteúdo de proteínas totais.

As análises do MET mostram que o cloroplasto das amostras tratadas com Cu e Pb não apresentaram muitas mudanças morfológicas, incluindo os plastoglóbulos. Os tratamentos com ambos metais, Cu e Pb, promoveram algumas alterações nos tilacóides. Por outro lado, as pequenas deformações nas membranas dos tilacóides provavelmente contribuíram para as mudanças na eficiência fotossintética como resultado das diferenças na difração e reflexão dos raios de luz nas membranas dos tilacóides. Em outros experimentos com Cd em algas vermelhas, deformações estruturais dos cloroplastos também foram observadas. (Talarico 2002; Bouzon *et al.* 2012b; Santos *et al.* 2013). Santos *et al.* (2014) observaram alterações nos tilacóides de *G. floridanum* tratados com Cd, Cu e Pb. Os plastoglóbulos são considerados materiais lipídicos (Bouzon *et al.* 2012a), e um aumento na quantidade de

plastoglóbulos, também, foram observados em *Ceramium ciliatum* exposto ao Cd (Diannelidis e Delivopoulos 1997).

Comparados aos tratamentos de Pb, a quantidade de carotenóides em *H. musciformis* mostrou redução. Os carotenóides podem agir como um mecanismo antioxidante, e eles são sintetizados e estocados nos cloroplastos como um antioxidante lipofílico (Römer *et al.* 2002). De acordo com Gouveia *et al.* (2013), a produção de carotenóides é uma estratégia para prevenir os efeitos de ERO. No presente estudo, a quantidade de flavonóides e fenólicos decresceram como um resultado do tratamento com Cu e Pb. De acordo com Cöllén *et al.* (2003), os flavonóides são sintetizados com o propósito de prevenir o estresse oxidativo. Em *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll, Bouzon *et al.* (2012b) observaram que a quantidade de flavonóides em amostras do ambiente foi maior que amostras controle ou tratadas com UV-B. Como determinado neste estudo, os flavonóides não foram sintetizados em quantidades substanciais; entretanto, é possível que a ação dos flavonóides como um antioxidante em *H. musciformis*, sob estresse por metal, não é tão efetivo quanto o que é demonstrado em outras algas.

6.4. Conclusão.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que os tratamentos de Cu e Pb em *H. musciformis* induzem diferentes respostas nas taxas de crescimento, nos pigmentos fotossintéticos, nas performances fotossintéticas, bem como na ultraestrutura, estas mudanças tornaram-se óbvias após o experimento de 7 dias. Danos ao aparato fotossintético e às membranas dos tilacóides foram evidenciados por descoloração, redução dos pigmentos e na biossíntese de grãos de amido. Entretanto, as células de *H. musciformis* não mostraram aumento na espessura das paredes celulares para prevenir a entrada de Cu e Pb. Consequentemente as células corticais tornaram-se vacuolizadas e, na microscopia de transmissão, metais foram observados no interior do vacúolo. Ambos tratamentos com Cu e Pb resultaram no decréscimo na quantidade de antioxidante, incluindo carotenóides, flavonóides e compostos fenólicos, e indicando que Cu é mais tóxico para *H. musciformis* que Pb.

7. CAPÍTULO III: Análise dos efeitos de chumbo e duas radiações fotossinteticamente ativas, 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em *Palisada flagellifera*.

7.1. Introdução.

O aumento do impacto ambiental em zonas costeiras afeta as taxas de crescimento, a fertilização e a germinação de muitos organismos (Okamoto *et al.* 2001). A descarga de poluentes, incluindo metais pesados, para o ambiente, expõe diretamente organismos marinhos aos diferentes níveis de toxicidade, que afetam o desenvolvimento diminuindo o crescimento e a biodiversidade (Torres *et al.* 2008). Dentre os metais pesados, o chumbo (Pb) é considerado um dos metais pesados mais tóxicos e são frequentemente encontrados contaminando plantas (Pourrut *et al.* 2011). Desde a antiguidade, este metal é utilizado para confecção de utensílios domésticos (Nriagu 1996) e atualmente sua utilização é, em grande escala, conferida à confecção de componentes eletrônicos, pigmentos, fertilizantes, gasolina-chumbada (Pourrot *et al.* 2011; Horta-Puga *et al.* 2014). Desta forma, o Pb se tornou um dos poluentes mais comuns encontrados nos efluentes industriais e urbanos (Sheng *et al.* 2004).

Nas plantas, os íons Pb podem destruir barreiras físicas como as estrias de Caspary em raízes (Liu e Pang 2010) bem como atravessar paredes celulares de algas vermelhas que possui polissacarídeos sulfatados (Gouveia *et al.* 2013; Santos *et al.* 2014; Santos *et al.* 2015). Uma vez vencidas as barreiras físicas, estes íons podem ser transportados via proteínas transportadoras de membranas de baixa afinidade por cátions (Pourrot *et al.* 2011). Na presença de Pb ocorre a queda na taxa de crescimento das algas (Gouveia *et al.* 2013; Santos *et al.* 2014; Santos *et al.* 2015) por promover a produção de ERO (Pourrot *et al.* 2011; Pinto *et al.* 2003) e desordem respiratória (Pourrot *et al.* 2011). Com isso, o Pb interfere também na síntese de carotenóides, importantes antioxidantes, inibindo também as catálises enzimáticas no ciclo de Calvin e aumentando a atividade das clorofilases (Liu *et al.* 2006). Juntamente com interferências na estrutura da clorofila (Pourrot *et al.* 2011), o Pb também pode promover desestruturação do cloroplasto (Gouveia *et al.* 2013; Santos *et al.* 2014, 2015).

Intensidades diferenciadas de luz podem promover alterações no tipo de lipídios e açúcares produzidos por algas (Khotimchenko *et al.* 2005), o que por sua vez altera a forma como a planta absorve os íons

(Bell *et al.* 2005). Deste modo, poderemos ter respostas diferentes a um metal, Pb por exemplo, dependendo da intensidade luminosa. Diferentes intensidades luminosas podem ainda promover outras alterações em algas como alterar a quantidade de prostaglandina em *Gracilaria verrucosa* (Imbs *et al.* 2001), mudanças na concentração de clorofila *a*, ficobiliproteínas, além de alterar as taxas de crescimento de cianobactérias (Bell *et al.* 2005). Segundo Häder *et al.* (2003) as algas adaptam-se rapidamente às mudanças da radiação fotossinteticamente ativa e também fazem o mesmo para UV-B (Schmidt *et al.* 2010abc, 2012abc, Pereira *et al.* 2014, Häder *et al.* 2003).

As algas são importantes produtoras primárias nos oceanos (Sheng *et al.* 2004). As algas vermelhas do complexo *Laurencia* são, também, potencialmente interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos, pois possuem grande variedade de metabólitos secundários (Gamal *et al.* 2010). Pode-se destacar estudos comprovando a existência de agentes inibidores de melanoma em algumas espécies do complexo *Laurencia* (Gamal *et al.* 2010). *Palisada flagellifera*, espécie pertencente a este grupo, ocorre desde a costa do partir Ceará até Santa Catarina. Esta alga foi registrada pela primeira vez no leste do Oceano Atlântico, mas atualmente este espécime é relatado para o Oceano Pacífico, Austrália, Hawaii, Ilhas Salomão e Filipinas, para o Oceano Índico, e para o oeste do Oceano Atlântico, México e Brasil (Gil-Rodríguez *et al.* 2010). Esta alga cresce na zona entre marés, fixada a rochas, em local moderadamente exposto à ação das ondas. Alguns estudos com *P. flagellifera* comprovaram a presença de substâncias citotóxicas para sarcoma uterino humano (Stein *et al.* 2011). Em outro trabalho, Pereira *et al.* (2014) descrevem os efeitos de UV-B em *P. flagellifera* tais como decréscimo nas taxas de crescimento, aumento no número de grãos de amido, desorganização dos tilacóides e aumento no número de plastoglóbulos. Ferreira *et al.* (2012) estudaram a estrutura química do complexo piruvato e da agarana sulfatada de *P. flagellifera*. No presente estudo, investigamos o efeito *in vitro* de chumbo em duas intensidades luminosas, em *P. flagellifera* avaliando (1) a viabilidade celular, as taxas de crescimento e (2) pigmentos fotossintéticos e o perfil metabólico.

7.2. Resultados.

7.2.1. Taxas de crescimento.

Durante os tratamentos sob as irradiâncias de 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as amostras controle (0 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$ Pb) de *P. flagellifera* apresentaram taxas de crescimento (Fig. 18) muito próximas quantificadas nos dias 4, 8 e 12, sendo 8,36% dia^{-1} e 8,07% dia^{-1} para as irradiâncias de 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ respectivamente. Porém, os tratamentos com Pb, somente na concentração de 0,5 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$ sob as irradiâncias de 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do quarto dia de experimento, apresentaram TC maior que a do controle. Os demais tratamentos apresentaram TC menores que o controle durante todo o experimento. Tratamento com maior concentração de Pb, 12,5 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$ nas duas irradiâncias, de 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, mostraram as menores taxas de crescimento sendo que na primeira irradiância foi de 1,2% dia^{-1} e para a última 0,9 % dia^{-1} .

Quanto à morfologia externa, as amostras de *P. flagellifera* durante os tratamentos sob as irradiâncias de 50 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 19) e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 20) tratadas com 0,5; 2,5 e 12,5 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$ de Pb não sofreram alterações nas ramificações e na pigmentação dos talos quando comparadas com as amostras controle.

Figura 18: Taxas de Crescimento de *P. flagellifera* após o período experimental. A: Experimento realizado com PAR 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. B: Experimento realizado com PAR 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras verticais que representam as m\acute{e}dias ($n=4$) \pm DP dos valores. As letras indicam as diferen\c{c}as significantes de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Figura 19: Morfologia das amostras de *P. flagellifera* após 4, 8 e 12 dias de tratamento com 0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb. Nenhuma modificação na morfologia externa dos talos tratados com PAR 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante os 12 dias foi verificada. Barras = 1cm

Figura 20: Morfologia das amostras de *P. flagellifera* após 4, 8 e 12 dias de tratamento com 0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb. Nenhuma modificação na morfologia externa dos talos tratados com PAR100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante os 12 dias foi verificada. Barras = 1cm

7.2.2. Viabilidade celular (MTT).

O resultado das absorbâncias do MTT demonstra a viabilidade celular (Fig. 21) onde os tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e com Pb (0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹) sob PAR de 50 e 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ possuem viabilidade menor que a amostra ambiente. Do mesmo modo, o tratamento controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) com PAR de 50 e 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram maiores que os outros tratamentos com a presença de Pb em todos os dias analisados (4, 8 e 12 dias respectivamente). Observa-se, também, que a viabilidade celular foi aumentando ao longo do experimento em todos os tratamentos com PAR de 50 e 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 21: Viabilidade celular das amostras de *P. flagellifera* após o período experimental. Barras verticais representam as médias (n=4) \pm DP das absorbâncias. As diferenças significativas foram calculadas com o teste de Tukey ($p \leq 0.05$) bifatorial. As letras minúsculas indicam a relação tratamento Pb *versus* tempo e as letras maiúsculas tratamento Pb *versus* PAR.

7.2.3. Pigmentos fotossintetizantes.

As quantidades de Cl *a* (Fig. 20) dos tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e com Pb (0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹) sob PAR de 50 μmol fótons m⁻².s⁻¹ foram menores que as amostras do campo, com exceção do tratamento controle aos 8 dias de experimento. Por outro lado, as amostras dos tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e com Pb (0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹) sob PAR de 100 μmol fótons m⁻².s⁻¹ apresentaram quantidades maiores que a amostra ambiente, com exceção ao oitavo dia de experimento onde os tratamentos com Pb apresentaram diminuição na quantidade de Cl *a*.

Os tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e com Pb (0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹) com PAR de 50 e 100 μmol fótons m⁻².s⁻¹ apresentaram variações nas quantidades de ficobiliproteínas (Fig. 21) durante os 12 dias de experimento em relação à amostra do campo. O tratamento controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) sob PAR de 50 μmol fótons m⁻².s⁻¹ apresentou menores quantidades de aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE) no quarto dia de experimento, em relação à mostra ambiente, houve um aumento durante os outros dias. Entretanto, o tratamento controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) sob PAR de 100 μmol fótons m⁻².s⁻¹ apresentou maiores quantidades de AFC, FC e FE no quarto dia de experimento e diminuiu durante os outros dias. Os tratamentos com 0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb sob 50 μmol fótons m⁻².s⁻¹ de PAR apresentaram quantidades de AFC, FC e FE maiores que as amostras ambiente e controle na maioria das medições, com exceção à quantidade de FC, no décimo segundo dia de experimento a amostra tratada com 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb que foi significativamente menor que todos os outros tratamentos. No entanto, o tratamento com 0,5 mg.Kg⁻¹ de Pb sob PAR de 100 μmol fótons m⁻².s⁻¹ apresentou as maiores quantidades de AFC, FC e FE nos primeiros 4 dias de experimentos enquanto as quantidades de AFC, FC e FE foram as menores no décimo segundo dia.

Quando observa-se as quantidades de carotenóides (Fig. 22) da amostra ambiente e dos tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e com Pb (0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹) sob PAR de 50 e 100 μmol fótons m⁻².s⁻¹ as quantidades da amostra ambiente foram maiores do que todas as outras amostras. Destaca-se ainda que as quantidades de carotenóides das amostras tratadas sob PAR de 100 μmol fótons m⁻².s⁻¹ foram maiores que as respectivas quantidades de carotenóides das amostras tratadas sob PAR de 50 μmol fótons m⁻².s⁻¹.



Figura 22: Concentração de Cl *a* e carotenóides das amostras do campo e dos tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e 0,5; 2,5; 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb, durante 4, 8 e 12 dias de cultivo. Os valores representam médias \pm DP (n = 4). As letras indicam as significâncias de acordo com o teste de Newman Keuls ($p \leq 0.05$) bifatorial. As letras minúsculas indicam a relação tratamento Pb *versus* tempo e as letras maiúsculas tratamento Pb *versus* PAR.

Figura 23: Concentração de pigmentos fotossintetizantes (ALO, FC e FE) nas amostras do campo e nos tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e 0,5; 2,5; 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb, durante 4, 8 e 12 dias de cultivo. Os valores representam médias \pm Desvio Padrão (n = 4). As letras indicam as significâncias de acordo com o teste de Newman Keuls ($p \leq 0.05$) bifatorial. As letras minúsculas indicam a relação tratamento Pb *versus* tempo e as letras maiúsculas tratamento Pb *versus* PAR.

7.2.4. Microscopia eletrônica de varredura.

As análises de raios-X com EDS na superfície das amostras de *P. flagellifera* nos tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb) e com Pb (0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹) sob PAR de 50 μmol fótons m⁻².s⁻¹ (Tabela 8) demonstraram a presença de diferentes elementos como carbono, nitrogênio, oxigênio, sódio, fósforo, potássio e cálcio em todas as amostras e a presença do Pb nas amostras tratadas com 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹ para todos os dias analisados. Enquanto as análises com EDS na superfície das amostras de *P. flagellifera* nos tratamentos controle (0 mg.Kg⁻¹ Pb), 0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg⁻¹ de Pb sob PAR 100 μmol fótons m⁻².s⁻¹ (Tabela 9), demonstraram a presença dos mesmos elementos da análise anterior, além da presença do Pb em todas as amostras tratadas com este metal.

Tabela 9: Análises com EDS-MEV, porcentagem de átomos na superfície das amostras de *P. flagellifera* tratados com PAR 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e controle, 0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg^{-1} de Pb após período experimental. Os valores representam médias $\pm\text{DP}$ ($n = 4$). As diferenças significantes foram calculadas com o teste de Tukey ($p \leq 0.05$) bifatorial. As letras minúsculas indicam a relação tratamento Pb *versus* tempo e as letras maiúsculas tratamento Pb *versus* PAR. O * significa sem diferença significativa.

4 dias

8 dias

12 dias

Tabela 10: Análises com EDS-MEV, porcentagem de átomos na superfície das amostras de *P. flagellifera* tratados com PAR 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e controle, 0,5; 2,5 e 12,5 mg.Kg^{-1} de Pb após período experimental. Os valores representam médias $\pm\text{DP}$ ($n = 4$). As diferenças significantes foram calculadas com o teste de Tukey ($p \leq 0.05$) bifatorial. As letras minúsculas indicam a relação tratamento Pb *versus* tempo e as letras maiúsculas tratamento Pb *versus* PAR. O * significa sem diferença significativa.

4 dias	
8 dias	
12 dias	

7.3. Discussão.

As taxas de crescimento (TC) das amostras controles de *P. flagellifera*, expostas as radiações de 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, não mostraram diferenças significativas ao longo do cultivo. Possivelmente houveram adaptações das rotas metabólicas, na síntese de pigmentos e compostos antioxidantes, em resposta a diferenças na intensidade luminosa. As taxas de crescimento das amostras de *P. flagellifera*, quando tratadas com Pb, em ambas as radiações, foram afetadas negativamente. Dentre as concentrações, as algas expostas a 12,5 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$ Pb foram as que mais sofreram diminuição das TC, sendo elas 0,9 e 1,2 $\%.\text{dia}^{-1}$, respectivamente, para as radiações de PAR de 50 e 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Trabalhos realizados com Pb nas algas *G. domingensis* (Gouveia *et al.* 2013), *G. floridanum* (Santos *et al.* 2014) e em *H. musciformis* (Santos *et al.* 2015) também demonstraram que Pb promoveu decréscimo nas taxas de crescimento. Estes processos devem ocorrer como resultado do bloqueio das divisões celulares mitóticas e redução da taxa de transporte de elétrons na fotossíntese na presença de chumbo (Rai *et al.*, 1981, Gouveia *et al.* 2013, Santos *et al.* 2014).

Nas análises com EDS associados à MEV, as amostras de *P. flagellifera* demonstraram que a radiação PAR de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ parece auxiliar a captura de íons Pb pelas paredes celulares das células corticais. Por outro lado, quando tratadas com 50 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 0,5 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$ de Pb, nas paredes celulares das células corticais das amostras não foi detectada a presença de Pb pelo EDS, ao longo dos períodos experimentais. Por sua vez, nas células corticais de todas as amostras tratadas com Pb sob irradiância de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para todos os períodos do experimento, foi verificada a presença de Pb nas paredes celulares. A alga *P. flagellifera* biossintetiza agarana sulfatada principalmente em C-2, presente na parede celular (Ferreira *et al.* 2012). A presença destes compostos sulfatados parece atuar como um quelante para estes íons. Em outras espécies de algas vermelhas, a presença de ágar na parede celular funciona como quelante à Pb (Gouveia *et al.* 2013; Santos *et al.* 2015). Assim, a parede celular age como uma barreira química à entrada de metais no citoplasma (Bouzon *et al.* 2012b; Gouveia *et al.* 2013; Santos *et al.* 2013, 2014, 2015). O tratamento com PAR de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pode ter promovido diferenças na composição de carboidratos, em relação à irradiância de 50 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, (Khotchimchenko *et al.* 2005). Provavelmente este aspecto deve ter favorecido a absorção de íons Pb pelas paredes celulares das amostras de

P. flagellifera tratadas com $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ Pb sob PAR de $100 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, j\acute{a} que o mesmo n\~{a}o ocorreu com paredes celulares das amostras tratadas com $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ Pb sob PAR de $50 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Na an\~{a}lise de quantifica\~{c}\~{a}o de ficobiliprote\~{i}nas, os tratamentos controles ap\~{o}s quatro dias de experimento, em ambas as radia\~{c}\~{o}es, apresentaram menor concentra\~{c}\~{a}o de pigmentos comparativamente \~{a}s amostras do ambiente. Entretanto, os tratamentos com PAR de $50 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram maior concentra\~{c}\~{o}es de ficobiliprote\~{i}nas do que os tratamentos com PAR de $100 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Estes resultados podem estar relacionados \~{a} necessidade de aumento da capacidade de captura de energia luminosa quando a alga est\~{a} exposta a menores intensidades luminosas. Segundo Schmidt *et al.* (2012) as ficobiliprote\~{i}nas formam um complexo antena auxiliar, ampliando a faixa do espectro luminoso de PAR capturado, com aumento no repasse de energia para o fotossistema II. Sendo assim, os tratamentos com Pb nas mesmas irradi\~{a}ncias apresentaram diferen\~{c}as de concentra\~{c}\~{a}o entres si e com controle. Esta redu\~{c}\~{a}o pode estar relacionada \~{a} degrada\~{c}\~{a}o de prote\~{i}nas na presen\~{c}a de \~{i}ons Pb, reconhecido inibidor do transporte de el\~{e}trons da fotoss\~{i}ntese (Rai *et al.*, 1981). Em *G. domingensis* cultivada com Pb ocorreu, tamb\~{e}m, um decr\~{e}scimo na quantidade de ficobiliprote\~{i}nas (Gouveia *et al.* 2013), e foi observado tamb\~{e}m em cianobact\~{e}rias devido \~{a} degrada\~{c}\~{a}o proteica promovida pelo metal (Bell *et al.* 2005).

A aus\~{e}ncia de padr\~{a}o para a concentra\~{c}\~{a}o de clorofila *a* dos tratamentos controles, comparando-se \~{a}s amostras ambiente, pode ser atribu\~{i}da \~{a}s condi\~{c}\~{o}es ecofisiol\~{o}gicas das algas no campo, portanto, o resultado dependeu de condi\~{c}\~{o}es anteriormente sofridas pelas amostras. Estes exemplares est\~{a}o submetidos a maiores diversidades de condi\~{c}\~{o}es abi\~{o}ticas que os exemplares adaptados de laborat\~{o}rio, o que poderia corroborar o resultado observado. J\~{a} as amostras controle sob PAR de $50 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tiveram concentra\~{c}\~{o}es de clorofila *a* menores do que a amostra controle sob PAR de $100 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Por este aspecto, pode-se dizer que a intensidade de PAR significa mais energia e, portanto, condi\~{c}\~{o}es de sintetizar mais clorofila. Em outros trabalhos, realizados com exposi\~{c}\~{a}o de algas vermelhas a diferentes metais pesados, foi observado, tamb\~{e}m, redu\~{c}\~{a}o na quantidade de clorofilas como o trabalho de Bouzon *et al.* (2012b) com Cd em *H. musciformis*, e de Gouveia *et al.* (2013) com Cu e Pb em *G. domingensis*.

Khotchimchenko *et al.* (2005) afirmam que as diferen\~{c}as nas radia\~{c}\~{o}es recebidas por algas modificam o metabolismo e causam a

diferenciação na composição de açúcares, proteínas e lipídios. O metal Pb é reconhecido por promover o aumento de EROs (Pourrot *et al.* 2011; Pinto *et al.* 2003) e desordem respiratória em macroalgas. Este aumento de EROs por sua vez, promove mudanças degenerativas na estrutura da clorofila (Pourrot *et al.* 2011), juntamente com a inibição das catálises enzimáticas no Ciclo de Calvin e aumento na atividade das clorofilases (Liu *et al.* 2006).

Os carotenóides são importantes compostos de baixo peso molecular, que atuam como antioxidantes (Liu *et al.* 2006). Em *P. flagellifera* as quantidades de carotenóides das amostras do ambiente foram maiores que todos os tratamentos realizados, indicando que no meio ambiente estes antioxidantes são necessários em maior quantidade quando comparados com as condições de laboratório. Entretanto, os resultados mostram que as concentrações dos carotenóides entre os tratamentos sob PAR foram maiores em $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ que as concentrações dos tratamentos em $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Conclui-se, assim, que a maior intensidade de PAR possibilita o aumento na síntese de carotenóides. Observou-se ainda que as concentrações de carotenóides dos tratamentos com Pb, em todas as concentrações, não foram menores que os respectivos controles, em ambas as irradiâncias. Estes dados evidenciam que não existe interação positiva entre as irradiâncias e a presença de íons Pb. Apesar de ser reconhecido o efeito negativo do Pb na síntese de carotenóides (Gouveia *et al.* 2013), nossos resultados não mostraram esta interferência, sendo a influência da intensidade de PAR a maior responsável pela variação observada na concentração deste composto. Sendo assim, na radiação de $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a energia obtida pelas amostras de *P. flagellifera* para a manutenção dos seus processos fisiológicos, não foi capaz de manter os níveis de síntese de carotenóides.

Similarmente, a viabilidade celular também foi afetada pela diferentes irradiâncias. As amostras do ambiente possuem viabilidade celular maior quando comparadas as amostras de laboratório. A PAR ambiente é maior que ambas as PAR utilizadas *in vitro* neste experimento (aproximadamente $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em dias claros e sem nuvens, no horário de maior intensidade – 12 a 13 h-) (dados coletados pelo LABCEV, BEG, CCB-UFSC; dados não publicados). Além disso, os respectivos controles de cada período de exposição e em ambas as PAR utilizadas em *P. flagellifera* mostraram viabilidade celular maior que todos os tratamentos com Pb correspondentes. Estes dados confirmam a interferência metabólica de Pb e consequente efeito na viabilidade celular

P. flagellifera. Relativo à radiação supõe-se que a maior intensidade de PAR esteja correlacionada a maior obtenção de energia para a produção de metabólitos. Com isto, possivelmente, houve o incremento na atividade mitocondrial, ampliando a viabilidade celular.

7.4. Conclusão.

O presente estudo revelou que as intensidades luminosas promoveram diferenças nas taxas de crescimento, nas quantidades de ficobiliproteínas, carotenóides e clorofila *a* além de interferir nas respostas da alga *P. flagellifera* ao Pb. Em síntese, demonstrou, também, que as diferentes PAR não induzem grandes diferenças nas taxas de crescimento. Porém, PAR com 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ promove aumentos nos conteúdos de ficobiliproteínas, clorofila *a*, carotenóides e viabilidade celular em relação aos tratamentos com 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de PAR. Já o Pb, induz redução nas taxas de crescimento e na viabilidade celular.

8. CAPÍTULO IV: Considerações finais.

Através do trabalho realizado com *G. floridanum* observou-se que cádmio é tóxico para esta alga uma vez que induziu uma série de mudanças nas características morfológicas estruturais e ultraestruturais, na taxa de crescimento, nos pigmentos fotossintetizantes, e nos flavonóides. A redução da autofluorescência, na ultraestrutura dos cloroplastos e na biossíntese de grãos de amido. Promoveu aumento de parede celular uma vez que a mesma está relacionada com as propriedades quelantes do ágar presente na composição amorfa da parede celular. Cádmio promoveu o aumento da síntese de carotenóides, provavelmente como uma defesa química contra ERO. Resultados semelhantes foram vistos por Bouzon *et al.* (2012b) ao tratar *H. musciformis* com Cd. O cádmio, via ações antrópicas, pode chegar ao ambiente marinho costeiro e interferir na biologia não só das algas em estudo mas, também outros seres que delas se alimentam, por exemplo.

Dentre os três metais estudados o cobre foi o que apresentou maior toxicidade para *G. floridanum* e *H. musciformis*. As concentrações utilizadas nestes dois experimentos foram diferentes sendo 50 e 100 μM Cu (\sim a 0,007 e 0,013 mg.Kg^{-1}) em *G. floridanum* e 0,05 e 0,1 mg.Kg^{-1} para *H. musciformis*. Nos dois experimentos o Cu foi o mais prejudicial mudando as características morfológicas, estruturais e ultraestruturais, reduzindo a taxa de crescimento, os pigmentos fotossintetizantes, os flavonóides e quantidades de clorofila *a*. A mudança mais marcante foi a despigmentação dos talos tratados com Cu de *G. floridanum* e *H. musciformis*. Provavelmente o fato de o Cu ser um micronutriente, as inúmeras proteínas carreadoras de Cu, explicam a maior toxicidade deste metal.

O metal chumbo, promoveu as menores alterações dentre todos os metais estudados com *G. floridanum* e *H. musciformis*. Houve redução nas taxas de crescimento, nas quantidades de ficobiliproteínas, alterações morfológicas e ultraestruturais menores que as promovidas por cádmio e cobre. No experimento com *P. flagellifera* chumbo promoveu repostas diferentes de acordo com a intensidade de PAR, por exemplo, chumbo juntamente com PAR de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ promoveu maiores concentrações de carotenóides bem como no experimento de *G. floridanum* onde o experimento foi realizado com PAR de 80 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Os resultados indicam que a suscetibilidade de *G. floridanum*, *H. musciformis* são diferentes para cada metal utilizado. Seria interessante

realizar experimentos consorciados entre estes metais, bem como, reavaliar as normativas para presença de metais nos oceanos. O experimento com chumbo em *P. flagellifera* com duas intensidades de PAR indicaram que mais experimentos serão necessários com várias algas e outros fatores consorciados. Os ecossistemas são muito dinâmicos e há muitos aspectos que poderão influenciar nas respostas morfológicas e fisiológicas das algas ante os metais pesados como PAR, tempo de exposição ao sol (maré baixa), salinidade, correnteza marinha, entre outros fatores.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahalya N. Ramachandra TV, Kanamadi RD (2003) Biosorption of heavy metals. *Res J Chem Environ* 7(7): 71-79.
- Alessandretti T, Rabelo APB, Soler JGM (2005) Comparação do potencial de remoção de metais pesados por meio de adsorção usando algas e aguapés. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.
- Amado-Filho GM, Karez CS, Andrade LR Yoneshigue-Valentin Y, Pfeiffer WC (1997) Effects on growth and accumulation of zinc in six seaweed species. *Ecotoxicol Environ Saf* 37: 223-228.
- Amado-Filho GM, Andrade LR, Karez CS, Farina M, Pfeiffer WC (1999) Brown algae species as biomonitors of Zn and Cd Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Environ Res* 48: 213-224.
- Andrade LR, Farina M, Amado-Filho GM (2002) Role of *Padina gymnospora* (Dictyotales, Phaeophyceae) cell walls in cadmium accumulation. *Phycologia* 41(1): 39-48.
- Andrade LR, Farina M, Amado-Filho GM (2004) Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotoxicol Environ Saf* 58(1): 117-125.
- Andrade LR, Leal R, Noseda M, Duarte MER, Pereira MS, Mourão PAS, Farina M, Filho GMA (2010) Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Mar Poll Bull* 60: 1482-1488.
- Armisen R (1995) World-wide use and importance of *Gracilaria*. *J Appl Phicol* 7: 231-243.
- Arnold W, Mitrenga D, Mayresbach H (1975) Gefriertrocknung und einbettung in glycolmethacrylat (GMA). *Ergebnisse Histochemischer Reaktionen*. *Acta Histochem* 14: 271-277. 1975.
- Arunakumara KKIU, Xuecheng Z (2009) Effects of heavy metals (Pb^{2+} and Cd^{2+}) on the ultrastructure, growth and pigment contents of the

unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Chin J Ocean Limnol 27(2): 383-388. DOI: 10.1007/s00343-009-0383-6

Bell PRF, Fu F (2005) Effect of light on growth, pigmentation and N₂ fixation of cultured *Trichodesmium* sp. from the Great Barrier Reef lagoon. Hydrobiologia 543: 25–35.

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005) Toxic metals in plants. Braz. J Plant Physiol 17,1.

Berchez AS, Oliveira EC (1989) Maricultural assays with the carrageenophyte *Hypnea musciformis* in São Paulo, Brazil. Hydrobiologia 260-261: 255-261.

Berchez FAS, Pereira RTL, Kamiya NF (1993) Culture of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) on artificial substrates attached to linear ropes. Dev Hydrobiol 85: 415-420.

Bouzon ZL (1993) Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales – Rhodophyta). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 66 pp.

Bodnar RJ (2009) Heavy Metals or Punk Rocks? Sci 323: 724-725.

Bouzon ZL, Miguens F, Oliveira EC (2000) Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). Cryptog Algol 21: 33-47.

Bouzon ZL (2006) Histochemistry and ultrastructure of the ontogenesis of the tetrasporangia of *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). Rev Bras Bot 29(2): 229-238. [In Portuguese].

Bouzon ZL, Chow F, Simioni C, Santos RW, Ouriques LC, Felix MRL, Osorio LKP, Gouveia C, Martins RP, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Schmidt EC (2012a) Effects of Natural Radiation, Photosynthetically Active Radiation and Artificial Ultraviolet Radiation-B on the Chloroplast Organization and Metabolism of *Porphyra acanthophora*

var. *brasiliensis* (Rhodophyta, Bangiales). *Microsc Microanal* 18: 1467–1479.

Bouzon ZL, Ferreira EC, Santos RW, Scherner F, Horta PA, Maraschin M, Schmidt EC (2012b) Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* Rhodophyta, Gigartinales cultivated *in vitro*. *Protoplasma* 249: 637–650.

Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding *Anal Biochem* 72: 248–254.

Calfa BA, Torem ML (2007) Biorreagentes - aplicações na remoção de metais pesados contidos em efluentes líquidos por biossorção/bioflotação. *Metal Mater* 60(3): 537-542.

Callow ME, Callow J (2002) Marine biofouling: A sticking problem. *Biologist* 49: 1–5.

Chagas FA, Dore MG, Castro CMPG, Nascimento AJG, Cruz MS, Soriano AKM, Benevides EM, Leite NMB, Lisboa E (2012) Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *J App Phycol* 24(5): 1217-1227.

Cóllen J, Pinto E, Pedersen M, Colepicolo P (2003) Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Arch Environ Contam Toxicol* 45(3): 337–342.

Da Gama BAP, Carvalho AGV, Weidner K, Soares AR, Coutinho R, Fleury BG, Teixeira VL, Pereira RC (2008) Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. *Botanica Marina* 51: 191-201.

Das P, Samantaray S, Rout GR (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Poll* 98(1): 29-36.

Diannelidis BE, Delivopoulos SG (1997) The effects of zinc, copper and cadmium on the fine structure of *Ceramium ciliatum* (Rhodophyceae, Ceramiales). *Mar Environ Res* 44(2): 127-134.

Domouhtsidou GP, Dimitriadis VK (2000) Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) Arch Environ Contam Toxicol 38(4): 472-478.

Edwards P (1970) Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Arkansas, Texas. Contrib Mar Sci 15: 1–228.

Eick MJ, Peak JD, Brady PV, Pesek JD (1999) Kinetics of lead adsorption and desorption on goethite: residence time effect. J Soil Sci 164: 28–39.

Favero N, Cattalini F, Bertaggia D, Albergoni V (1996) Metal accumulation in a biological indicator (*Ulva rigida*) from the Lagoon of Venice (Italy). Arch Environ Contain Toxicol 31: 9–18.

Felix MRL, Osorio LKP, Ouriques LC, Farias-Soares FL, Steiner N, Kreusch M, Pereira DT, Simioni C, Costa GB, Horta PA, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2014) The Effect of cadmium under different salinity conditions on the cellular architecture and metabolism in the red alga *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales) Microsc Microanal 20(5): 1411–1424.

Fernandes DRP, Oliveira VP, Valentin YY (2014) Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. J Appl Phycol 26(5): 1923–1937.

Ferreira FG, Noseda MD, Gonçalves AG, Ducatti DRB, Fujii MT, Duarte MER (2012) Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). Carbohydrate Research 347: 83-94.

Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. Sci Tot Environ 317: 207-233.

Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tour U (1999) Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Appl Environ Microbiol 65: 3727–3729.

Fujii MT, Sentíes A (2005) Taxonomia do complexo Laurencia (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo. In Sentíes A, Dreckmann KM (eds) Monografias Ficológicas. II. Universidade Autônoma Metropolitana-Iztapalapa, México e Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil, p. 69-135.

Fujii MT, Guimarães SMPB, Gurgel CF, Fredericq S (2006) Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. *Phycologia* 45: 432-441.

Gahan PB (1984) Plant Histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic Press London, 301pp.

Gamal EAA (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J* 18: 1-25.

Ganesan M, Thiruppathi S, Jha B (2006) Mariculture of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux in South east coast of India. *Aquaculture* 256(1-4): 201-211.

Gantt E (1981) Phycobilisomes. *Annu Rev Plant Physiol* 32: 327-347.

Garcia-Rios V, Freile-Pelegrin Y, Robledo D, Mendoza-Cozat D, Moreno-Sanchez R, Gold-Bouchota G (2007) Cell wall composition affects Cd²⁺ accumulation and intracellular thiol peptides in marine red algae. *Aquatic Toxicology* 81: 65-72.

Gil-Rodríguez MC, Cassano V, Aylagas E, Sentíes A, Díaz-Larrea J, Oliveira MC, Fujii MT (2010) *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta) from the Canary Islands, Spain: a new record for the eastern Atlantic Ocean based on morphological and molecular evidence. *Bot Mar* 53: 31-40

Gouveia C, Kreusch M, Schmidt EC, Felix MRL, Osorio LKP, Pereira DT, Santos R, Ouriques LC, Martins RP, Latini A, Ramlov F, Carvalho TJG, Chow F, Maraschin M, Bouzon ZL (2013) The Effects of Lead and

Copper on the Cellular Architecture and Metabolism of the Red Alga *Gracilaria domingensis*. Microsc Microanal 19: 513-524.

Graham LE, Wilcox LW (2000) Algae. First edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River. 640pp.

Greger M, Ogren E (1991) Direct and Indirect Effects of Cd^{2+} on Photosynthesis in Sugar Beet (*Beta vulgaris*). Plant Physiol 83(1): 129-135.

Guimarães M, Plastino EM, Oliveira EC (1999) Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Bot Mar 42: 481-486.

Guiry MD, Guiry GM (2014) AlgaeBase: World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. Disponível em <http://www.algaebase.org>. (25/08/2014 acessado às 16:40h).

Häder DP, Lebert M, Helbling W (2003) Effects of solar radiation on the Patagonian rhodophyte *Corallina officinatis* (L.) Photosynth Res 78: 119–132.

Hamdy AA (2000) Biosorption of heavy metals by marine algae. Curr Microbiol 41: 232-238.

Hashim MA, Chu KH (2004) Biosorption of cadmium by brown, green and red seaweeds. Chem Eng J 97: 249–255.

Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can J Bot 57: 1332-1334.

Horta-Puga G, Carriquiry JD (2014) The Last Two Centuries of Lead Pollution in the Southern Gulf of Mexico Recorded in the Annual Bands of the Scleractinian Coral *Orbicella faveolata*. Bull Environ Contam Toxicol 92: 567-573.

Hu S, Tang CH, Wu M (1996) Cadmium accumulation by several seaweeds. Sci Total Environ 187: 65–71.

Imbs AB, Vologodskaya AV, Nevshupova NV, Khotimchenko SV, Titlyanov EA (2001) Response of prostaglandin content in the red alga *Gracilaria verrucosa* to season and solar irradiance. *Phytochemistry* 58(7): 1067-1072.

Janik E, Szczepaniuk J, Maksymiec W (2013) Organization and functionality of chlorophyll–protein complexes in thylakoid membranes isolated from Pb-treated *Secale cereal*. *J Photochem Photobiol B Biol* 125:98–124

Khotimchenko SV, Yakovleva IM (2005) Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry* 66(1): 73-79.

Kumar M, Kumari P, Gupta V, Anisha PA, Reddy CRK, Jha B (2010) Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). *Biometals* 23: 315-325.

Küpper H, Setlik I, Spiller M, Küpper FC, Prasil O (2002) Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *J Phycol* 38: 439-441.

Kursar TA, van Der Meer J, Alberte RS (1983) Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiol* 73: 353–360.

Lee RE (1989) *Phycology*. Cambridge University Press, New York, 2^a ed, 715pp.

Lee RE (2008) *Phycology*. Cambridge University Press, New York, 4^a ed, 547pp.

Lee T, Huang Y, Chen M (2005) Copper induction of phosphorus deficiency in *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia* 44(6): 620-628.

Li M, Hu C, Zhu Q, Chen Li, Kong Z, Liu Z (2006) Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere* 62: 565–572.

Liu F, Pang SJ (2010) Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms in reactive oxygen species in two intertidal red algae *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*. J Exper Mar Biol Ecol 382: 82–87.

Lockwood MP (1976) Effects of Pollutants on Aquatic Organisms. Cambridge University Press, New York.

Lombardi AT, Vieira AAH (1998) Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae). Phycologia 37: 34–39.

Machado KRSS, Broocke NB (2007) Análise de propriedade anti-incrustante em cinco espécies de macroalgas marinhas da Praia do Poá - Penha, SC. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

Mallick N, Rai LC (2001) Physiological responses of non vascular plants to heavy metals. In: Prasad MNV, Strzalka K (Eds.) Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp.111–147.

Mamboya FA, Pratap HB, Mtolera M, Bjork M (1999) The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency of the brown macroalga *Padina boergensenii*, in: Richmond M.D., Francis J. (Eds.) Proceedings of the Conference on Advances on Marine Sciences in Tanzania. pp. 185–192.

Maxwel K, Jhonson GN (2000) Review article: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. J Exper Bot. 51(345): 659–668.

Mendes LF, Zambotti-Villelav L, Colepicolo P, Marinho-Soriano E, Stevani CV, Yokoya NS 2013 Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. J Appl Phycol 25: 1939–1947

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55–63.

Nriagu JO (1996) A history of a global metal pollution. *Sci* 272: 223-224.
 Nunes JMC (2005) Rodofíceas marinhas bentônicas do Estado da Bahia, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 410pp.

Okamoto OK, Colepicolo P (2001) Circadian protection against reactive oxygen species involves changes in daily levels of the manganese-and iron-containing superoxide dismutase isoforms in *Lingulodinium polyedrum*. *Biol Rhythm Res* 32: 439–448.

Oliveira EC (2003) Introdução a Biologia Vegetal. 2ª Ed. São Paulo: EDUSP. 272 pp.

Oliveira MMF, Kleinubing SJ, Silva MGC (2005) Bioadsorção de cádmio em banho finito utilizando alga marinha *Sargassum sp.* VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.

Painter TJ (1983) Residues of d-lyxo5-hexosulopyranuronic acid in *Sphagnum holocellulose* and their role in cross-linking. *Carbohydr Res* 124: 18–21.

Penniman CA, Mathieson AC, Penniman CE (1986) Reproductive Phenology and Growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary. New Hampshire. *Bot Mar* 29: 47-154.

Pereira DT, Schmidt EC, Bouzon ZL, Ouriques LC (2014) The effects of ultraviolet radiation-B response on the morphology, ultrastructure, and photosynthetic pigments of *Laurencia catarinensis* and *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta): a comparative study. *J Appl Phicol* 26(6): 2443-2452.

Pinchasov Y, Berner T, Dubinsky Z (2006) The effect of lead on photosynthesis, as determined by photoacoustics in *Synechococcus leopoliensis* (Cyanobacteria). *Water Air Soil Pollut* 175, 117–125.

Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phicol* 39: 1008–1018.

Platt T, Gallegos CL, Harrison WG (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J Mar Res* 38(4): 687-701.

Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Whitacre DM, Pinelli, Eric (2011) Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 213: 113-136.

Pueschel C (1979) Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J Phycol* 15: 409-424.

Raven JA (1990) Carbon metabolism. In COLE, K. M. & SHEATH, R. G. *Biology of the red algae*. British Library, New York, 1^a Ed: 171-201.

Reviere B (2006) *Biologia e filogenia das algas*. Porto Alegre: Artmed. 280pp.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.

Roberts DA, Poore AGB, Johnston EL (2006) Ecological consequences of copper contamination in macroalgae: effects on epifauna and associated herbivores. *Environ Toxicol Chem* 25(9): 2470-2479.

Rocchetta I, Leonardi PI, Amado Filho GM, Molina MDR, Conforti V (2007) Ultrastructure and X-ray microanalysis of *Euglena gracilis* (Euglenophyta) under chromium stress. *Phycologia* 46: 300-306.

Römer S, Lubeck J, Kauder F, Steiger S, Adomat C, Sandmann G (2002) Metabolic genetic engineering of azeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Engineering* 4: 263-272.

Santos RW, Schmidt EC, Paula MR, Latini A, Horta PA, Maraschin M, Bouzon ZL (2012) Effects of cadmium on growth, photosynthetic pigments, photosynthetic performance, biochemical parameters and structure of chloroplasts in the agarophyte *Gracilaria domingensis* Rhodophyta, Gracilariales. *Am J Plant Sci* 3: 1077-1084.

Santos RW, Schmidt EC, Bouzon ZL (2013) Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. *Protoplasma* 250: 297–305. DOI 10.1007/s00709-012-0412-8

Santos RW, Schmidt EC, Felix MRL, Osorio LKP, Kreusch M, Pereira DT, Simioni C, Chow Ho FF, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2014) Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidium floridanum*: physiological responses and ultrastructure features. *Ecotox Environ Saf* 105: 80-89.

Santos RW, Schmidt EC, Vieira IC, Costa GB, Rover T, Simioni C, Barufi JB, Soares CHL, Bouzon ZL (2015) The effect of different concentrations of copper and lead on the morphology and physiology of *Hypnea musciformis* cultivated in vitro: a comparative analysis. *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-014-0751-8.

Scariot LA, Rover T, Zitta CS, Horta PA, Oliveira EC, Bouzon ZL (2013) Effects of UV-B radiation on *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales): germination of tetraspores and early sporeling development. *J App Phycol* 25(2): 537-544.

Schmidt EC, Santos R, Horta PA, Maraschin M, Bouzon (ZL 2010a) Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron* 41(8): 919–930.

Schmidt EC, Nunes BG, Maraschin M, Bouzon ZL (2010b) Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. *Photosynthetica* 48(2): 161–172.

Schmidt EC, Maraschin M, Bouzon ZL (2010c). Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth and photosynthetic pigments. *Hydrobiologia* 649: 171–182.

Schmidt EC, Pereira B, Pontes CLM, Santos R, Scherner F, Horta PA, Paula MR, Latini A, Maraschin M, Bouzon ZL (2012a) Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the

carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). *Protoplasma* 249: 353–367.

Schmidt EC, Pereira B, Santos R, Gouveia C, Costa GB, Faria GSM, Scherner F, Horta PA, Paula MR, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2012b) Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after *in vitro* exposure to UV-B. *Aquatic Bot* 100: 8–17.

Schmidt EC, Santos R, Faveri C, Horta PA, Paula MR, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2012c) Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation B: changes in ultrastructure pigments and antioxidant systems. *J Appl Phycol* 24: 1341–1352.

Sharma P, Dubey RS (2005). Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 35–52.

Sheng PX, Ting Y, Chen JP, Hong L (2004) Sorption of lead, copper, cadmium, zinc and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. *J Coll Interf Sci*. 275: 131-141.

Silva PC, Basson PW, Moe RL (1996) Catalogue of the marine algae of the Indian Ocean. *Univ Calif Public Bot* 79: 1251-1259.

Silva EA, Cossich ES, Tavares CG, Cardoso Filho L, Guirardello R (2003) Biosorption of binary mixtures of Cr(III) and Cu(II) ions by *Sargassum sp.* *Braz J Chem Engin* 20(3): 213-227.

Simioni C, Rover T, Schmidt ÉC, Felix MRL, Polo LK, Santos R, Burle G, Kreusch M, Pereira DT, Ouriques LC, Bouzon, ZL (2014) Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). *J Phycol* 50: 577-586.

Sousa-Pinto I, Murano E, Coelho S, Felga A, Pereira R (1999) The effect of light on growth and agar content of *Gelidium pulchellum* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in cultura. *Hydrobiologia* 398/399: 329–338.

South GR, Whittick A (1987) Introduction to Phycology. First publication. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 341pp.

Spurr, ARA (1969) low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26: 31-43.

Stein EM, Andregueti DX, Rocha CS, Fujii MT, Baptista MS, Colepicolo P, Indig GL (2011) Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia* complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean with emphasis on the Brazilian State of Espírito Santo. Braz J of Pharmacog 21(2): 239-243.

Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhari I, Sherwood RP (2006) The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiol Plant 63(3): 293–298.

Talarico L (1996) Phycobiliproteins and phycobilissomes in red algae: adaptative responses to light. Sci Mar 60: 205-222.

Talarico L (2002) Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. Environ Pollut 120: 813-821.

Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P (2008) Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. Ecotoxicol Environ Saf 71: 1–15.

Tureck C, Oliveira T, Cremer M, Bassfeld J (2007) Avaliação da concentração de metais pesados em tecido de ostras *Crassostrea gigas* (Molusca, Bivalve) cultivadas na Baía da Babitonga, litoral norte de Santa Catarina. Pesticidas: Rev Ecotoxicol Meio Amb, 16. doi:10.5380/pes.v16i0.7479

Vallee BL, Ulmer DD (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Annual Reviews: 91-128.

van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM (1989) Algae: An introduction to Phycology. Cambridge: Cambridge University Press, 627pp.

Vilar VJP, Botelho CMS, Boaventura RAR (2008) Lead and copper biosorption by marine red algae *Gelidium* and algal composite material in a CSTR (“Carberry” type). Chem Eng J 138: 249-257.

Visvik I, Rachlin JW (1992) Ultrastructural Changes in *Dunaliella minuta* Following Acute and Chronic Exposure to Copper and Cadmium. Arch Environ Contam Toxicol 23: 420-425.

Weidner K, Lages BG, Da Gama BAP, Molis M, Wahl M, Pereira RC (2004) Effect of mesograzers and nutrient levels on induction of defenses in several Brazilian macroalgae. Mar Ecol Prog Ser 283: 113–125.

Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J Plant Physiol 144: 307-313.

Woolery ML, Lewin RA (1976) Effects of Pb on Respiration and Photosynthesis of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). Water Air Soil Poll 6: 25-31. 1976.

Woelkerling WMJ (1990) Chapter one: An introduction. In: COLE, K. M. & SHEATH, R. G. org. Biology of the Red Algae. Cambridge University press: 1-6.

Xia JR, Li YJ, Lu J, Chen B (2004) Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. Bull Environ Contam Toxicol 73: 979–986.

Yokoya NS, Stirk, WA, Johannes van S, Novák O, Turečková V, Pencík A, Strnad M (2010) Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from brazil. J Phycol 46(6): 1529-8817.

Yoon HS, Müller KM, Sheat RG, Ott FD, Bhattacharya D (2006) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). J Phycol 42: 482-492.

Yruela I (2005) Copper in plants. Braz J Plant Physiol 17: 145–146.

Zacarias AA, Moresco HH, Horst H, Brighente IMC, Marques MCA, Pizzollati MG (2007) Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no

extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul.